

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA – XXIII Ciclo

DIVERSITÀ E CONSERVAZIONE DI PIANTE EUROPEE MINACCIATE

DIVERSITY AND CONSERVATION OF EUROPEAN THREATENED PLANTS

(BIO/02)

Coordinatore:

Prof.ssa Laura Zucconi

Tutor:

Prof. Silvano Onofri

Dottoranda:

Cristina Olmati

Dr. Paola Arduino

INDICE

	pag.
INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1. MATERIALI E METODI	9
1.1. Materiali	9
1.2. Metodi	9
1.2.1. Test di germinazione	9
1.2.2. Riproduzione <i>in vitro</i>	15
1.2.3. Osservazioni allo stereomicroscopio	15
1.2.4. Trasferimento di plantule propagate	19
1.2.5. Analisi dei dati sulla germinazione <i>in vitro</i>	19
1.2.6. Tecniche elettroforetiche, sistemi gene-enzima, loci studiati	21
1.2.7. Elaborazione statistica dei dati elettroforetici	27
 CAPITOLO 2. RICERCHE SULLA GERMINAZIONE <i>IN VITRO</i> E SULLA	
STRUTTURA GENETICA DI TAXA DEL GENERE <i>SANTOLINA</i>	30
2.1. Introduzione	30
2.2. Specie studiate	35
2.3. Test di germinazione e riproduzione <i>in vitro</i> : risultati	65
2.4. Ricerche genetiche su taxa del genere <i>Santolina</i> : risultati	81
 CAPITOLO 3. RICERCHE SULLA GERMINAZIONE <i>IN VITRO</i> E SULLA	
DIVERSITÀ GENETICA DI POPOLAZIONI DI <i>HOTTONIA PALUSTRIS</i>	104
3.1. Introduzione	104
3.2. Test di germinazione e riproduzione <i>in vitro</i> : risultati	114
3.3. Ricerche popolazionistiche e genetiche	
<i>Hottonia palustris</i> : risultati	120

CAPITOLO 4. RICERCHE SULLA GERMINAZIONE <i>IN VITRO</i> E SULLA	
STRUTTURA GENETICA DI <i>PRIMULA PALINURI</i>	127
4.1. Introduzione	127
4.2. Test di germinazione e riproduzione <i>in vitro</i>: risultati	139
4.3. Ricerche genetiche su <i>Primula palinuri</i>: risultati	145
CONCLUSIONI	153
BIBLIOGRAFIA	155
SITI INTERNET	185
RINGRAZIAMENTI	186

INTRODUZIONE

La diversità degli esseri viventi e la loro distribuzione sul territorio variano continuamente, per effetto dei processi evolutivi innescati dai cambiamenti climatici a lungo e breve termine, a seguito dell'azione umana, ecc.

L'impatto dell'uomo sull'ambiente naturale avviene a diverse scale spaziali e temporali. I disastri ecologici, l'inquinamento industriale, la deforestazione e la conversione di habitat naturali in terreni agricoli e industriali si verificano ininterrottamente su vaste aree di ciascun continente. Tutte queste attività antropiche alterano l'habitat per molte specie vegetali e animali e determinano una riduzione della biodiversità. Dove avvengono cambiamenti ambientali catastrofici, il maggiore impatto sulla biodiversità avviene istantaneamente, sebbene effetti residui possono prolungarsi per diversi anni. Sono stati identificati cinque importanti fattori che determinano cambiamenti nella biodiversità su scala globale (Sala *et al.*, 2000): cambiamenti dell'uso del suolo, cambiamenti climatici, aumento della concentrazione di anidride carbonica (CO₂) atmosferica, deposizioni azotate e piogge acide, introduzione di specie animali e vegetali esotiche.

Le attività umane legate ai cambiamenti dell'uso del suolo degradano sistematicamente ecosistemi e habitat causando spesso anche la loro completa scomparsa: quando la qualità dell'ambiente è così bassa da non poter più sostenere la sopravvivenza di una specie chiave si può arrivare, infatti, alla perdita sia di un habitat che dell'intero ecosistema. La causa principale del cambiamento dell'uso del suolo è rappresentata dall'espansione della popolazione umana che converte ecosistemi naturali in ecosistemi dominati dall'uomo. Il risultato principale di queste azioni è una frammentazione dell'habitat e quindi del paesaggio.

Quasi in tutti i casi, la frammentazione può ridurre la diversità delle specie native nel loro habitat naturale poiché piccole e isolate porzioni di territorio sono caratterizzate da: (1) una minore eterogeneità ambientale, (2) una minore presenza di specie rare e sensibili alle dimensioni dell'area, (3) piccole popolazioni più vulnerabili alle estinzioni locali, (4) una limitata immigrazione, (5) una limitata

presenza di specie vagili. La frammentazione conduce quindi ad ecosistemi dominati da specie opportunistiche, caratterizzate da una buona capacità di dispersione, colonizzazione, crescita rapida e con brevi cicli di vita.

Con l'attuale consapevolezza dell'importanza della diversità biologica sul nostro pianeta e con la convinzione che questa oggi sia a rischio, si è sviluppata la biologia della conservazione. Questa disciplina scientifica sfrutta le conoscenze dell'ecologia e della biologia, al fine di pianificare e gestire il patrimonio ambientale e conservare la diversità delle forme di vita sul nostro pianeta.

Il problema della conservazione è complesso, poiché, le situazioni sono differenti per la singola specie, per lo stato dello specifico habitat e dell'intero ecosistema. Dunque, per rispondere in modo concreto alle diverse tipologie di rischio, sono state sviluppate strategie di conservazione a diverso livello. Si parla pertanto di conservazione delle specie, di conservazione degli habitat, di conservazione delle comunità e degli ecosistemi.

Conservare una specie significa mantenere la specie vitale e proteggerla dalla minaccia di estinzione attraverso interventi appropriati. Questi possono riguardare la conservazione della specie nel suo habitat originario, ed in questo caso si parla di conservazione *in situ*, oppure la costituzione ad esempio di orti botanici e banche del germoplasma che permettono la sopravvivenza della specie in al di fuori del suo ambiente naturale, attuando quindi una procedura di conservazione *ex situ*.

Nel caso della conservazione *in situ* si tende a proteggere oltre alla specie anche il suo habitat, al contrario la conservazione *ex situ* si preoccupa solo della singola specie.

Conservazione *in situ*

La strategia di conservazione *in situ* implica il ripristino delle popolazioni nel loro habitat. Questa forma di conservazione ha come fine il mantenimento della diversità delle risorse genetiche, delle forme e dei processi adattativi delle specie e dei suoi ecosistemi.

La conservazione *in situ* è sicuramente l'approccio più complesso perché non si limita alla protezione di uno o pochi individui, ma preserva gli equilibri di una o più popolazioni della stessa specie. Essa pone anche attenzione ai rapporti con gli altri membri dell'ecosistema e ai fattori abiotici che possono interagire con essi.

Per quanto riguarda le strategie di conservazione degli habitat o degli ecosistemi, l'unico approccio possibile è quello di mantenere le loro condizioni naturali inalterate. È però evidente che la conservazione di un ecosistema è assolutamente più complessa della protezione di una singola specie. Si tratta di un intervento di gran lunga più solido e duraturo nel tempo, ma anche molto più difficile. Infatti, le condizioni ambientali da tutelare non sono spesso ben definibili e le proposte di conservazione avanzate sono spesso in contrasto con differenti decisioni sociali sulla destinazione dello specifico territorio da preservare o di quelli adiacenti.

Conservazione delle specie e variabilità genetica

La conservazione di una specie richiede conoscenze approfondite sulla sua distribuzione, sullo stato delle sue diverse popolazioni, sui suoi mezzi di diffusione e sulla sua fisiologia. Solo in base a queste conoscenze sarà possibile definire la strategia da adottare per la sua tutela. Tutte queste informazioni sono necessarie per l'individuazione della Minima Popolazione Vitale (MVP - Minimum Viable Population), cioè della popolazione di più piccole dimensioni che possa avere il 99% di probabilità di persistere a lungo nonostante le prevedibili avversità legate a variazioni climatiche e ad eventi naturali (Shaffer 1981; Primack, 2008). Una volta definita la MVP, è possibile procedere alla valutazione della Minima Area Dinamica (MDA - Minimum Dynamic Area), cioè della minima dimensione che deve avere l'habitat perché si possa conservare la MVP.

La strategia legata alla MVP può tuttavia presentare problemi legati alla possibile riduzione della variabilità genetica della popolazione a causa della perdita di alleli rari. Ciò è correlato con un fattore probabilistico: se il numero degli individui

con alleli rari diminuisce, la probabilità di trasmettere tali alleli alla progenie si riduce.

Un secondo problema che può intervenire negativamente nella conservazione di popolazioni ridotte è legata al fenomeno della depressione da inbreeding, dovuto all'incrocio tra individui strettamente imparentati. Una popolazione con un basso numero di piante ha una probabilità più elevata di favorire incroci tra individui con corredo genetico molto simile rispetto ad una popolazioni di dimensioni maggiori. L'incrocio tra individui strettamente imparentati può portare all'espressione di alleli recessivi, presenti allo stato eterozigote nelle piante parentali, ma che divengono omozigoti nella progenie. In questo caso la loro espressione potrebbe comportare conseguenze gravi per la competitività delle successive generazioni.

È da considerare anche il fenomeno di depressione da outbreeding, dovuto al fatto che individui di popolazioni troppo piccole possono riprodursi solo in seguito a fecondazione con polline prodotto al di fuori della popolazione stessa. L'incrocio tra individui geneticamente lontani può essere positivo, creando variabilità genetica, ma, in qualche caso, può portare ad una prole indebolita (sterilità, ridotta probabilità di sopravvivenza, incompatibilità cromosomica tra i genitori). Questi fenomeni sono estremamente complessi da prevedere anche se esistono alcuni strumenti, come i marcatori molecolari, che possono contribuire a studiarli.

In definitiva, per definire la MVP bisogna considerare le caratteristiche genetiche e riproduttive della popolazione. Per esempio, è noto che l'autogamia riduce la variabilità genetica delle piante mentre l'allogamia incrementa tale diversità. Saranno quindi differenti le strategie adottate per conservare una specie autogama stretta da una allogama. Al fine di garantire un giusto equilibrio nel tempo, è molto importante calcolare la percentuale di sopravvivenza della progenie.

In base ai dati conoscitivi così raccolti, la conservazione *in situ* di una specie o di un ecosistema potrà comportare la creazione di nuove aree protette, il miglioramento della gestione di quelle già presenti, la promozione di sistemi di tutela dell'ambiente al di fuori delle stesse o, ancora, il ripristino delle comunità biologiche negli habitat degradati (Primack, 2008).

Tuttavia, per molte specie rare la conservazione *in situ* non è realizzabile oppure non avrebbe alcun effetto a causa del disturbo e dell'impatto antropico. Quindi l'unico modo per evitare la definitiva scomparsa di una specie è il mantenimento degli individui in condizioni artificiali sotto la supervisione dell'uomo (Kleiman *et al.*, 1996) realizzando la strategia nota come conservazione *ex situ*.

Conservazione *ex situ*

Conservare *ex situ* significa mantenere gli organismi selezionati al di fuori del loro habitat naturale. Lo scopo è quello di assicurare loro una concreta protezione dal rischio di estinzione, nel caso in cui questa non sia garantita *in situ*. A tale fine sono nate strutture specializzate per la conservazione del germoplasma sotto differenti forme: si possono conservare organismi vegetali prelevati dal loro habitat, o i loro semi oppure anche il loro DNA in luoghi o banche altamente specializzati.

La conservazione *ex situ* viene presa in considerazione quando il taxon in oggetto è gravemente minacciato nel suo ambiente, oppure il numero di individui di una specie è talmente ridotto da prevederne l'estinzione anche in un habitat recuperato.

Lo svantaggio principale di questa strategia di conservazione è che le specie sono mantenute al di fuori del loro habitat, senza alcuna relazione con l'ecosistema in cui normalmente vivono.

Questo approccio alla conservazione non è applicabile a tutte le specie vegetali viventi perché non tutte le piante sono coltivabili in giardini botanici e non tutti i semi germinano con facilità. La conservazione *ex situ* può inoltre portare all'adattamento della pianta a condizioni ambientali differenti da quelle che si trovano in natura e rendere quindi difficoltosa l'attuazione di programmi di reintroduzione.

In tutti questi casi, è più vantaggioso adottare una strategia di conservazione *in situ* che tuteli le popolazioni rare o minacciate in piccole aree protette e caratterizzate da condizioni ambientali opportune, affiancata ad una struttura *ex situ* (serre o laboratorio) che si occupi della riproduzione delle piante. In questo ultimo caso si può ricorrere anche a tecniche di riproduzione vegetativa o di coltura *in vitro* allo scopo di produrre alti numeri di individui geneticamente identici: la popolazione manterrà in

tal modo le caratteristiche genetiche della specie, evitando mutazioni genetiche e la conseguente selezione di linee varianti adattate condizioni *ex situ* diverse da quelle originali.

Nei piani di conservazione *ex situ* devono essere considerati differenti fattori. Primo tra tutti la scelta del materiale da conservare (piante intere, semi, DNA), poi le metodologie di laboratorio o serra che garantiscono la sopravvivenza e la conservazione del materiale. È inoltre importante definire da quanti e quali individui/popolazioni dovranno essere campionati i semi da conservare affinché si abbia una buona rappresentatività delle specie e delle sue popolazioni negli habitat considerati. L'analisi, con marcatori molecolari, di un numero adeguato di popolazioni (e di individui all'interno delle popolazioni), è un requisito indispensabile per la realizzare l'intervento di conservazione.

I due approcci più usati per la conservazione *ex situ* di specie vegetali sono: (1) conservazione *in vivo*: cioè mantenimento e allevamento di piante in strutture protette, quali parchi, riserve, giardini botanici; (2) conservazione nelle banche del germoplasma. A questi due approcci si unisce un a forma estrema di conservazione di specie vegetali ovvero quella di DNA o sequenze specifiche di questo. Tuttavia questo tipo di conservazione non assicura la sopravvivenza della specie, ma solo dei suoi geni.

Gli orti botanici

I giardini botanici, complessivamente 1'600 in tutto il mondo, sono risorse fondamentali per la conservazione di specie a rischio, veri e propri serbatoi di materiale genetico. I dati ad oggi disponibili parlano di circa 80'000 specie conservate presso queste strutture, pari a circa il 30% della flora mondiale, per un totale di 4 milioni di piante (Guerrant *et al.*, 2004; www.bgci.org). A queste si uniscono le specie coltivate in serre private o giardini, sebbene con un ridotto numero di individui. Questo approccio ha il vantaggio di mantenere e moltiplicare la specie nella sua forma vegetativa controllandone i pool genetici anche se spesso i costi di

gestione sono onerosi e non sempre sono sostenibili, soprattutto se le specie da conservare richiedono condizioni particolari (climi estremi, grandi spazi, ecc.).

Le banche del germoplasma

Le banche che del germoplasma costituiscono attualmente il mezzo migliore per la conservazione *ex situ* di specie vegetali. Le prime banche del germoplasma, realizzate negli Orti Botanici del Regno Unito alla fine degli anni '70, si mostrarono da subito uno dei migliori strumenti per prevenire la perdita di biodiversità e garantire un futuro alle specie in pericolo di estinzione nei siti di origine. Oggi le banche del germoplasma presenti nel mondo sono circa 1300, distribuite essenzialmente nei paesi industrializzati e, in particolare, in quelli anglosassoni. La più autorevole banca del germoplasma su scala mondiale è, oggi, la britannica Millenium Seed Bank (MSB) che opera nell'ambito dei Royal Botanic Gardens di Kew e vanta un'esperienza trentennale nel settore della conservazione di semi delle specie spontanee (Linington, 2001). In Europa se ne contano circa 150, di cui una ottantina nei paesi nord europei e settanta nell'area mediterranea; queste ultime sono distribuite essenzialmente in Italia, Francia, Grecia e Spagna (Bacchetta, 2006; 2008).

Ad oggi ogni istituzione ha maturato una propria esperienza, elaborando protocolli e metodologie differenti funzionali alle proprie risorse umane ed economiche ed alle strumentazioni a disposizione.

Scopo della ricerca

Questa tesi è dedicata alla conservazione di alcune specie vegetali minacciate della flora europea. Per realizzare gli scopi previsti è stato raccolto materiale per effettuare sperimentazioni sulla conservazione *ex situ*, *in vitro* di germoplasma delle specie in oggetto e, più specificamente semi. Le tecniche messe a punto serviranno ad avviare la concreta conservazione del germoplasma presso la Banca del Germoplasma dell'Orto Botanico della Tuscia (Università degli Studi della Tuscia, Viterbo).

Parallelamente si è svolto lo studio della variabilità genetica di popolazioni delle specie oggetto del presente studio al fine di aiutarne la valutazione dello stato di minaccia e approfondirne la conoscenza anche a livello tassonomico.

Nello specifico sono state studiate:

- le specie italiane ed alcune iberiche del genere *Santolina*, asteracee che, specialmente in Italia, presentano un areale relitto e sono minacciate perché spesso rappresentate da una singola o da poche popolazioni;
- l'*Hottonia palustris*, una primulacea propria delle zone umide che vive in raccolte d'acqua ferma e poco profonda, ed è minacciata dalla riduzione dell'habitat;
- la primula di Palinuro (*Primula palinuri*), endemismo delle coste tirreniche meridionali, vulnerabile a causa dell'attuale ristrettezza e discontinuità del suo areale e dal crescente impatto antropico, legato principalmente allo sviluppo del turismo balneare.

CAPITOLO 1

MATERIALI E METODI

1.1. Materiali

L'indagine genetica è stata condotta su materiale fogliare oppure piantine ottenute da semi; semi e foglie raccolti sul campo. Le foglie, appena colte, sono state poste in sacchetti di plastica, subito collocati in un frigorifero portatile e quindi trasportate in laboratorio. Qui le foglie sono state estratte dai sacchetti e congelate a -80 ° C per mantenere nel tempo l'integrità delle molecole enzimatiche.

I semi raccolti sono stati e conservati alla temperatura di 25°C e quindi utilizzati per i test di germinazione e le colture *in vitro*.

Semi raccolti nel 2006 e 2007 sono stati conservati in una camera di deidratazione (15-20% di umidità relativa, 15°C). Semi raccolti nel 2004 sono stati conservati a 4°C.

Al fine di evitare gravi danni alle popolazioni naturali, è stata raccolta solo una piccola quantità di semi per ciascuna pianta (come regola generale si consiglia di raccogliere non più del 20% dei semi a disposizione in modo da assicurare la naturale riproduzione della pianta; www.rbgekew.org.uk).

Le popolazioni e specie studiate, le località e le date di raccolta, le sigle adottate, ecc. sono riportati nelle Tabb. 1, 2,3.

1.2. Metodi

1.2.1. Test di germinazione

Per ciascuno dei taxa studiati sono stati condotti studi sulla germinazione *in vitro* e sulla biologia riproduttiva, non solo per mettere a punto nuovi protocolli ma anche per poter utilizzare i semi delle popolazioni con maggiore diversità genetica,

Tab. 1. Sigle e dati di raccolta dei campioni di popolazioni di *Santolina* dell'Italia e della Spagna. Raccoglitori: CO = C. Olmati; BG = B. Gaetani; JLM = J. Lorite Moreno. Materiale: L = foglie; S = semi. Condizioni di stoccaggio dei semi: a = buste di carta/temperatura ambiente (25°C); b = buste di carta/15-20% di umidità relativa e 15°C.

Taxon Numero cromosomico	Sigla	Località	Altitudine m s.l.m.	Latitudine (N)	Longitudine (E)	Data raccolta	Raccoglitori	Materiale
<i>S. ligustica</i> Arrigoni, 1977 $2n = 18$	SLL	tra Levanto e Bonassola, La Spezia, Liguria (Italia)	10	44° 10' 14,47"	9° 36' 51,31"	27.11.2009	CO	L/Sa
<i>S. pinnata</i> Viviani, 1802 = <i>S. leucantha</i> Bertoloni, 1819 $2n = 18$	SPO	Pian della Fioba, Massa, Toscana (Italia)	900	44° 3' 28,37"	10° 11' 26,07"	17.06.2010	CO	L
<i>S. etrusca</i> (Lacaita) Marchi e D'Amato, 1973 $2n = 18$	SEA	Torrente Fossatello, R.N. Monterufeno, Acquapendente, Viterbo, Lazio (Italia)	260	42° 46' 54,66"	11° 55' 36,94"	12.10.2006	BG	Sb
	SEB	Bassano Scalo, Bassano in Teverina, Viterbo, Lazio (Italia)	65	42° 29' 00"	12° 20' 00,47"	04.10.2006 28.05.2009 06.07.2009 09.10.2009	BG CO CO CO	Sb L L Sb
	SER	Sponde fiume Orcia, Radicofani, Siena, Toscana (Italia)	400	42° 52' 19,39"	11° 45' 32,91"	30.09.2009 09.10.2010	CO CO	L/Sa L/Sa
<i>S. neapolitana</i> Jord. et Fourr., 1869 $2n = 18$	SNF	Monte Faito, Castellammare di Stabia, Napoli, Campania (Italia)	250	40° 40' 52,05"	14° 29' 18,43"	29.10.2009	CO	L/Sa

(continua)

Tab. 1. (Continua/2).

Taxon Numero cromosomico	Sigla	Località	Altitudine m s.l.m.	Latitudine (N)	Longitudine (E)	Data raccolta	Raccoglitori	Materiale
<i>S. benthamiana</i> Jord. e Fourr., 1869 = <i>S. chamaecyparissus</i> subsp. <i>tomentosa</i> (Pers.) Arcangeli, 1882 $2n = 18$	SBG	Sierra de Lújar (dintorni di Granada, Spagna)	1410	36°51'50.16"	3°25'34.4"	29.10.2009	JLM	Sa
<i>S. viscosa</i> Lagasca, 1816 $2n = 18$	SVG	Sorbas, Los Yesares, Almeria (dintorni di Granada, Spagna)	400	37°5'29.68"	2°4'54.39"	07.10.2009	JLM	Sa
<i>S. marchii</i> Arrigoni , 1977 = <i>S. chamaecyparissus</i> L. $5x = 45$	MVT	nursery nei dintorni di Viterbo (Italia)				2010		
“ “	MMP	nursery nei dintorni di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées, Francia)				2010		
<i>S. insularis</i> (Fiori) Arrigoni, 1979 = <i>S. chamaecyparissus</i> subsp. <i>insularis</i> (Gennari ex Fiori) Yeo, 1975 = <i>S. corsica</i> subsp. <i>insularis</i> $6x = 54$	IMP	nursery nei dintorni di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées, Francia, da talee di individui nel campo della Sardegna centro-meridionale)				2010		

Tab. 2. Sigle e dati di raccolta dei campioni di popolazioni di *Hottonia palustris* dell'Italia e dei Paesi Bassi. Raccoglitori: CO = C. Olmati, MP = M. Piazzai, PB = P. Boonekamp. Materiale: L = foglie; S = semi. Condizioni di stoccaggio dei semi: a = buste di carta/temperatura ambiente (25°C); b = buste di carta/15-20% umidità relativa e 15°C.

Sigla	Località	Altitudine m s.l.m.	Latitudine (N)	Longitudine (E)	Data di raccolta	Raccoglitori	Materiale
HHE	Dintorni di Hengelo, Overijssel (Paesi Bassi)	15	52° 19' 31,83"	6° 47' 20,56"	30.06.2010	PB	L
HSR	Tenuta di San Rossore, Pisa, Toscana (Italia)	10	43° 42' 59,43"	10° 18' 58,47"	03.06.2009	CO	L
HMR	R.N. Monte Rufeno, Acquapendente, Viterbo, Lazio (Italia)	200	42° 45' 42,39"	11° 55' 10,80"	14.05.2007 11.06.2009	MP CO, MP	Sb L
HMO	Laghetto di Montieri, Montieri, Grosseto, Toscana (Italia)	450	43° 08' 04,08"	11° 03' 53,56"	13.05.2009	CO	L

Tab. 3. Sigle e dati di raccolta dei campioni di popolazioni di *Primula palinuri*. Raccoglitori: LG = L. Garofalo; CM = C. Mosco; LB = L. Bullini; CO = C. Olmati.

Sigla	Località	anno di raccolta	raccoglitori
PPP	Capo Palinuro (Campania meridionale)	dal 2004 al 2010	LG, CM, LB
PPC	Marina di Camerota (Campania meridionale)	2005, 2006, 2008	CM, LB
PPI	Punta degli Infreschi (Campania meridionale)	2007, 2009	LB, CM, CO
PPV	Vallone del Marcellino (Campania meridionale)	2005, 2006, 2008	LB, CM
PPM	dintorni di Maratea (Basilicata)	2005, 2007, 2010	CM, LB, CO
PPD	Isola di Dino, (Calabria settentrionale)	dal 2004 al 2010	LG, CM, LB

mantenuti presso la Banca del Germoplasma della Tuscia, per reintroduzioni mirate e programmi di conservazione in situ ed *ex situ*.

Parte delle piante ottenute durante questa fase sono state utilizzate per le indagini genetiche, mentre gli individui rimanenti, attualmente mantenuti all'interno di una camera climatica, verranno coltivati presso l'Orto Botanico di Viterbo.

Gli Orti Botanici e le banche dei semi, oltre a costituire attualmente il mezzo migliore per la conservazione *ex situ* del germoplasma vegetale e della biodiversità, sono anche strutture cui è possibile attingere per eseguire interventi di reintroduzione *in situ*.

I test di germinazione sono stati effettuati tra il 2009 e il 2010. I semi sono stati immersi in acqua distillata per 0 (controllo), 24 e 48 ore (Iglesias *et al.*, 2000; Feijóo *et al.*, 2000; GENMEDOC, 2004-2006) a temperatura ambiente. Successivamente sono stati lavati con una soluzione contenente Tween 20 (0,01% - 0,1%, v/v) per 10 minuti. Infine, sono stati sottoposti a tre lavaggi con acqua distillata sterile. La semina è stata effettuata in piastre Petri (9 cm di diametro) o multiwell (12, 24 pozzetti) contenenti il terreno di germinazione (1% agar per la coltura dei tessuti vegetali, Applichem) (GENMEDOC, 2004-2006; Bacchetta *et al.*, 2006; 2008). Per la specie *Hottonia palustris* al mezzo di germinazione è stato aggiunto acido gibberellico (250g/ml di GA₃). Per evitare la denaturazione l'ormone è stato sterilizzato per filtrazione e aggiunto al mezzo di crescita solo dopo la sterilizzazione in autoclave (Morgan *et al.*, 1997). Per ogni test sono state effettuate tre repliche, ciascuna contenente 12, 24 o 30 semi. Le colture sono state sigillate con Parafilm in modo da prevenire una perdita eccessiva di acqua ed evitare eventuali contaminazioni. Successivamente sono state incubate all'interno di una camera di coltura dotata di lampade a luce fluorescente bianca fredda (Osram Dulux L 36W/840 Lumilux, 2900 lm), con un fotoperiodo di 12 h, e una temperatura di 20 ± 1°C (GENMEDOC, 2004-2006; Bacchetta *et al.*, 2006, 2008). Per garantire l'assenza di effetti sistematici dovuti alla posizione delle colture all'interno della camera, queste sono state spostate tutti i giorni (Yang *et al.*, 1999). I dettagli delle tecniche di germinazione utilizzate sono riportati nella Tab. 4, 5.

1.2.2. Riproduzione *in vitro*

Sono state effettuate prove di riproduzione *in vitro* per ottenere rapidamente un numero elevato di individui di *Santolina*, necessari per i saggi genetici; tali prove prevedono la sterilizzazione superficiale dei semi e l'utilizzo di un mezzo di coltura costituito da macro-micronutrienti e arricchito con saccarosio (protocollo modificato da Iglesias *et al.*, 2000).

I semi sono stati lavati prima con acqua di rubinetto per 30 minuti, e poi con una soluzione costituita da un fungicida (Nystatin, Applichem) e dimetilsolfossido (1g/50 ml) per 45 minuti. Successivamente i semi sono stati sterilizzati secondo lo schema descritto di seguito: i semi sono stati immersi in una soluzione di NaClO (2,5% v/v) contenente Tween 80 (4% v/v) per 10 minuti, e poi sottoposti a tre lavaggi con acqua distillata sterile della durata di 10 minuti ciascuno. Una volta sterilizzati sono stati seminati in multiwell (24 pozzetti) contenenti il mezzo di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) a cui è stato aggiunto saccarosio (3% v/v, Applichem). La soluzione è stata portata al volume finale con acqua distillata, correggendo il pH mediante una soluzione 0,1 M di KOH al valore richiesto di 5.6 -5.7. Infine, al mezzo liquido è stato aggiunto agar per la coltura dei tessuti vegetali (0,8% v/v, Applichem) e sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti e ad una pressione di 2 atm.

Per ogni specie sono state effettuate tre repliche. Le colture sono state incubate con le stesse modalità dei test di germinazione descritte sopra.

1.2.3. Osservazioni allo stereomicroscopio

Le colture sono state esaminate ogni giorno, per un tempo compreso tra 30 e 60 giorni, mediante uno stereomicroscopio (Nikon SMZ 1000). Questo ha reso possibile l'annotazione dei tempi e delle percentuali di sviluppo delle diverse specie. Il tutto è stato documentato attraverso lo scatto di microfotografie utilizzando una macchina fotografica (Nikon Digital Camera DXM 1200), collegata al microscopio stesso, e il software ACT-1 (versione 2) per l'acquisizione e la gestione delle immagini.

Tab. 4. Tecniche di germinazione utilizzate per *Santolina*. (c) = controllo; n = numero di repliche; N_B = numero di semi utilizzati per ogni replica. SEB* = semi raccolti nel 2006 e conservati all'interno di una camera di deidratazione (15-20% di umidità relativa e 15°C); SEB** = semi raccolti nel 2009 e conservati a temperatura ambiente (25°C).

Taxon	Sigla	Pretrattamento	Soluzione lavaggio	Mezzo di germinazione	n	N _B	Condizioni di germinazione
<i>S. ligustica</i>	SLL	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
<i>S. etrusca</i>	SEA 0h (c)	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEA 24h	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEA 48h	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEB* 0h (c)	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEB* 24h	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEB* 48h	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)

(continua)

Tab. 4. (Continua/2).

Taxon	Sigla	Pretrattamento	Soluzione lavaggio	Mezzo di germinazione	n	N _B	Condizioni di germinazione
<i>S. etrusca</i>	SEB** 0h (c)	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEB** 24h	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h at 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
	SEB** 48h	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h at 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
<i>S. neapolitana</i>	SNF	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
<i>S. benthamiana</i> - SBG		---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)
<i>S. viscosa</i>	SVG	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	30	T= 20°C 12/12h; capsule petri (Ø 9 cm)

Tab. 5. Tecniche di germinazione utilizzate per *Hottonia* e *Primula*. (c) = controllo; n = numero di repliche; N_B = numero di semi utilizzati per ogni replica.

Taxon	Sigla	Pretrattamento	Soluzione lavaggio	Mezzo di germinazione	n	N _B	Condizioni di germinazione
<i>H. palustris</i>	HP 0h (c)	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.01%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	24	T= 20°C 12/12h; multiweel
	HP 24h	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.01%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	24	T= 20°C 12/12h; multiwell
	HP 48h	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h a 25°C	H ₂ Odist e Tween 20 (0.01%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	24	T= 20°C 12/12h; multiwell
	HP-GA ₃	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.01%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%); GA ₃ 250mg/l	3	24	T= 20°C 12/12h; multiwell
<i>P. palinuri</i>	PPP	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	12	T= 20°C 12/12h; multiwell
	PPD	---	H ₂ Odist e Tween 20 (0.1%, v/v)	H ₂ Odist e agar (1%)	3	12	T= 20°C 12/12h; multiwell

1.2.4. Trasferimento di plantule propagate

Dopo quattro/cinque settimane dalla semina le plantule ottenute sono state lavate accuratamente per eliminare ogni traccia del mezzo di coltura e successivamente trasferite in contenitori di plastica trasparente contenenti terriccio sterile e acqua distillata sterile. I contenitori sono stati sigillati con Parafilm e collocati in una camera climatica (fotoperiodo 12/12h; $20 \pm 1^\circ\text{C}$). I dettagli sulla composizione del terriccio utilizzato per i diversi taxa sono indicati nella Tab. 6.

1.2.5. Analisi dei dati sulla germinazione *in vitro*

Alla fine di ogni esperimento sono stati determinati i seguenti parametri: percentuale di semi germinati (G); velocità di germinazione (T_{50}). Il T_{50} è il parametro maggiormente utilizzato per determinare la velocità di germinazione. Si calcola in numero intero di giorni e corrisponde al tempo necessario per ottenere il 50% della capacità germinativa del campione di semi (Côme, 1970). Tale valore è calcolato per interpolazione lineare secondo la formula in Coolbear *et al.* (1980), modificata secondo la definizione fornita da Thanos e Doussi (1995). Inoltre è stata calcolata la percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni (C); la percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia di foglie (F) e la percentuale di individui sopravvissuti al trasferimento su terriccio (S).

L'analisi dei dati ottenuti è stata eseguita usando il programma di elaborazione statistica SYSTAT (versione 3.5). I parametri osservati nei test di germinazione e nella riproduzione *in vitro* sono stati esaminati mediante il Tukey test (Siegel e Tukey, 1960). Nel caso di piccoli campioni di dati, è stato utilizzato il test t di Student (Gosset, 1908).

Tab. 6. Composizione dei terricci (ammendanti torbosi composti) utilizzati. Le concentrazioni sono espresse come percentuale volume/volume e massa/volume (mg/l) sulla sostanza secca e come parti per milione (ppm) sulla sostanza secca. La conduttività elettrica è espressa come deciSiemens per metro (dS/m).

	Percentuale % V/V	Percentuale % m/V	p.p.m.
<i>Santolina</i>			
Carbonio organico (C) di origine biologica sul secco	30,00		
Carbonio umico e fulvico sul secco (C)	7,00		
Azoto (N) organico sul secco	0,70		
Rame (Cu) totale sul secco			30
Zinco totale sul secco (Zn)			100
Torba	65		
Conducibilità	0,45 dS/m		
Rapporto C/N	50		
<i>Hottonia</i>			
Carbonio organico(C)	56,00		
Azoto organico (N)	2,00		
Sostanza organica	95,00		
pH	4-5,5		
<i>Primula</i>			
Azoto (N)		250	
Fosfato (P ₂ O ₅)		230	
Potassio (K ₂ O)		320	
Magnesio (Mg)		160	
Zolfo (S)		150	
pH	5,5 (CaCl ₂)		
Salinità	1,5g/l		

1.2.6. Tecniche elettroforetiche, sistemi gene-enzima, loci studiati

L'analisi dei sistemi gene-enzima è stata effettuata mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido. Foglie, porzioni di fusti e radici o plantule ottenute da semi sono stati utilizzate come fonte di enzimi. L'amido utilizzato (10-12% Connaught/Starch Art) gel è stato sciolto nel sistema tampone più adatto per ogni enzima, in percentuale variabile dal 10 al 14,5%. La soluzione è stata fatta bollire per circa 15 minuti, è stata poi degassata con una pompa da vuoto e versata su piastre di vetro di 16 x 21,5 x 0,7 cm. Il gel è stato quindi lasciato raffreddare.

Il tessuto di ciascun individuo è stato meccanicamente omogenato in mortai con circa 0.5 ml di tampone di estrazione (modificato da Soltis *et al.*, 1983): 0.2 M tris-HCl, 14 mM β -mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 10^{-3} M ditiotreitolo (DDT), cloruro di magnesio 0.01 M, PVP 30 0.002 M, pH 7,5, a cui sono stati aggiunti alcuni granelli di sabbia per favorire la rottura della parete cellulare. Cartellini (3 x 5 mm) di carta Whatmann n° 3 sono stati imbibiti nell'omogenato e inseriti verticalmente nel gel ad un'altezza di circa da 2,5 cm dal bordo di uno dei lati maggiori della piastra.

La migrazione è stata condotta in una camera termostata alla temperatura di 4°C. All'interno di tale camera i gel sono poggiati orizzontalmente su vaschette contenenti il tampone più adatto e provviste di elettrodi al platino. La continuità tra gel e tampone è assicurata da apposite spugnette. L'apparato è collegato ad un alimentatore di corrente continua in grado di dare 6 - 9V/cm (misurato sul gel) per 3 - 5 ore. Al termine della migrazione vengono estratti i cartellini e il gel viene tagliato orizzontalmente con un filo di nylon, in modo da ottenere due o più fette. Ciascuna di esse viene poi trattata con una soluzione colorante specifica. Le soluzioni coloranti utilizzate vengono generalmente solidificate con agar 0,6% sciolto in soluzione tampone tris-HCl 0,05 M, pH 8, precedentemente portato ad ebollizione e poi raffreddato alla temperatura di 48°C; alcune vengono utilizzate allo stato liquido. I gel vengono incubati alla temperatura di 37°C al buio per un tempo variabile da 15 minuti ad alcune ore.

Gli isozimi (= enzimi con simile proprietà catalitiche ma codificati da geni diversi) evidenziati sono stati indicati con numero progressivo rispetto alla loro

mobilità elettroforetica relativa (per esempio *Mdh-1* ha una migrazione anodica più veloce rispetto a *Mdh-2* e così via). Gli allozimi (= varianti enzimatici codificati da alleli di un singolo gene) sono stati indicati con un indice che esprime la loro mobilità relativa, espressa in mm, rispetto all'allele più frequente (= 100) nella popolazione di riferimento. Gli alleli con indici > 100 hanno una mobilità relativa maggiore, mentre quelli con indice < 100 una mobilità minore. Le popolazioni di riferimento per i taxa studiati sono:

Santolina: popolazione di Bassano in Teverina (Lazio) di *S. etrusca*;

Hottonia: popolazione del Laghetto di Montieri (Toscana) di *H. palustris*;

Primula: popolazione dei Monti Lucretili (Lazio) di *P. vulgaris*.

Nelle Tabb. 7, 8, 9, 10 sono riportati gli enzimi saggiati con il loro numero di codice, i loci analizzati, le condizioni di migrazione, i metodi di evidenziazione e sistemi tampone utilizzati per evidenziare gli enzimi nei taxa studiati.

Tab. 7. Enzimi studiati con il numero di codice internazionale (E.C.), geni codificanti per i vari enzimi e condizioni di migrazione elettroforetica (+ = anodica) in *Santolina*. Per i sistemi tampone vedi la Tab. 10. Le tecniche di colorazione utilizzate seguono, con piccole modifiche, Cheliak e Pitel, 1984 (a), Selander *et al.*, 1971 (b), Morden *et al.*, 1987 (c), Yamada e Guries, 1989 (d), Soltis *et al.*, 1983 (e), e Harris e Hopkinson, 1976 (f).

Enzima	E.C.	Geni	Migrazione	V/cm	Tempo (h)	Sistema tampone	Tecnica di colorazione
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdh</i>	+	7	3	4	a
Malato deidrogenasi (NADP ⁺)	1.1.1.40	<i>Mdhp</i>	+	7	3	4	b
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	<i>Idh-1</i>	+	7	3 ½	1	c
		<i>Idh-2</i>	+	7	3 ½	1	c
6-Fosfogluconato deidrogenasi	1.1.1.44	<i>6Pgdh-1</i>	+	7	3 ½	4	a
		<i>6Pgdh-2</i>	+	7	3 ½	4	a
Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfatasi	2.7.7.9	<i>Ugpp-1</i>	+	7	3	5	d
		<i>Ugpp-2</i>	+	7	3	5	d
Aconitasi	4.2.1.3	<i>Aco-1</i>	+	7, 8.5	3 ½, 3	1, 5	c
		<i>Aco-2</i>	+	7, 8.5	3 ½, 3	1, 5	c
Trioso fosfato isomerasi	5.3.1.1	<i>Tpi-1</i>	+	8, 7	3 ¾, 3	3, 2	e
		<i>Tpi-2</i>	+	8, 7	3 ¾, 3	3, 2	e
Glucosio fosfato isomerasi	5.3.1.9	<i>Gpi-1</i>	+	7, 8	3, 3 ¼	4, 3	f
		<i>Gpi-2</i>	+	7, 8	3, 3 ¼	4, 3	f
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	<i>Pgm-1</i>	+	7.5	3	2	f
		<i>Pgm-2</i>	+	7.5	3	2	f

Tab. 8. Enzimi studiati con il numero di codice internazionale (E.C.), geni codificanti per i vari enzimi e condizioni di migrazione elettroforetica (+ = anodica) in *Hottonia palustris*. Per i sistemi tampone vedi la Tab. 10. Le tecniche di colorazione utilizzate seguono, con piccole modifiche, Cheliak e Pitel, 1984 (a), Selander *et al.*, 1971 (b), Morden *et al.*, 1987 (c), Yamada e Guries, 1989 (d), Harris e Hopkinson, 1976 (e), e Wendel e Weeden, 1989 (f).

Enzima	E.C.	Geni	Migrazione	V/cm	Tempo (h)	Sistema tampone	Tecnica di colorazione
Scichimico deidrogenasi	1.1.1.25	<i>Skdh</i>	+	8	3	1	a
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdh-1</i>	+	7, 8	3 ¾, 3 ½	5, 4	a
		<i>Mdh-2</i>	+	7, 8	3 ¾, 3 ½	5, 4	a
		<i>Mdh-3</i>	+	7, 8	3 ¾, 3 ½	5, 4	a
		<i>Mdh-4</i>	+	7, 8	3 ¾, 3 ½	5, 4	a
Malato deidrogenasi (NADP ⁺)	1.1.1.40	<i>Mdhp</i>	+	7.5	3 ½	4	b
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	<i>Idh-1</i>	+	7	3 ½	1	c
		<i>Idh-2</i>	+	7	3 ½	1	c
6-Fosfogluconato deidrogenasi	1.1.1.44	<i>6Pgdh-1</i>	+	7	3 ½	4	a
NADH deidrogenasi	1.6.99.3	<i>NADHdh</i>	+	6	5	2	f
Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfatasi	2.7.7.9	<i>Ugpp-1</i>	+	7	4	5	d
		<i>Ugpp-2</i>	+	7	4	5	d
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	<i>Pgm-1</i>	+	6	5	2	e
		<i>Pgm-2</i>	+	6	5	2	e

Tab. 9. Enzimi studiati con il numero di codice internazionale (E.C.), geni codificanti per i vari enzimi e condizioni di migrazione elettroforetica (+ = anodica) in *Primula palinuri*. Per i sistemi tampone vedi la Tab. 10. Le tecniche di colorazione utilizzate seguono, con piccole modifiche, Cheliak e Pitel, 1984 (a), Yamada e Guries, 1989 (b), e Harris e Hopkinson, 1976 (c).

Enzima	E.C.	Geni	Migrazione	V/cm	Tempo (h)	Sistema tampone	Tecnica di colorazione
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdh-2</i>	+	7	4 ½	4	a
6-Fosfoglucomutasi deidrogenasi	1.1.1.44	<i>6Pgdh-2</i>	+	8, 7	4 ½, 4 ½	5, 4	a
NADH deidrogenasi	1.6.99.3	<i>NADHdh-2</i>	+	6.5	4 ½	2	a
Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfatasi	2.7.7.9	<i>Ugpp-1</i>	+	6.5	5	5	b
Glucosio fosfato isomerasi	5.3.1.9	<i>Gpi-2</i>	+	7	4	4	c
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	<i>Pgm-1</i>	+	6.5	4 ½	2	b
		<i>Pgm-2</i>	+	6.5	4 ½	2	b

Tab. 10. Sistemi tampone utilizzati per ponti e gel d'amido.

Tamponi	Ponti	Gel
1. Tris/citrato II, continuo (Selander <i>et al.</i> , 1971)	0.687 M tris/0.157 M acido citrico 1-H ₂ O pH 8 (83.2 g tris, 30 g acido citrico 1-H ₂ O)	0.023 M tris/0.005 M acido citrico 1-H ₂ O pH 8 (2.77 g tris, 1.10 g acido citrico 1-H ₂ O)
2. Tris/maleato (modificato da Brewer e Sing, 1970)	0.10 M tris/0.10 M acido maleico/0.01 M EDTA/ 0.01 M MgCl ₂ , pH 7.6 (12.11 g M tris, 11.61 g acido maleico, 3.72 g EDTA, 2.03 g MgCl ₂) portato a pH con NaOH 4 M	Tampone ponti diluito 1:10, pH 7.6
3. Tris/versene/borato (Brewer e Sing, 1970)	0.21 M tris/0.15 M acido borico/0.006 M EDTA, pH 8.6 (25.43 g tris/9.27 g acido borico/ 2.23 g M EDTA)	0.021 M tris/0.02 M acido borico/0.007 M EDTA, pH 8.6 (2.54 g tris/1.24 g acido borico/0.25 g EDTA)
4. Fosfato/citrato (Harris, 1966)	0.15 M citrato trisodico 2-H ₂ O/0.24 M sodio fosfato monobasico, pH 6.3 (44.11 g citrato trisodico 2-H ₂ O, 33.12 g NaH ₂ PO ₄)	Tampone ponti diluito 1:40, pH 6.3 (portato a pH con acido citrico 0.2 M)
5. Istidina/citrato (Cheliak e Pitel, 1984)	0.125 M tris, portato a pH 7 con 1 M acido citrico (15.14 g tris)	0.005 M DL-istidina-HCl 1-H ₂ O/1.4 mM EDTA, portato a pH 7 con 1 M tris, e diluito 4:1 (1.50 g istidina-HCl 1-H ₂ O, 0.50 g EDTA)

1.2.7. Elaborazione statistica dei dati elettroforetici

L'analisi genetica delle popolazioni studiate è stata eseguita usando i programmi di elaborazione statistica BIOSYS 2 (Black, 1997; modificato da Swofford e Selander, 1981), GENETIX 4.02 (Belkhir *et al.*, 2000), GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset, 1995) e PHYLIP (Felsenstein, 2005).

Le deviazioni tra le frequenze genotipiche osservate nelle popolazioni studiate e quelle attese sulla base dell'equilibrio di Hardy-Weinberg sono state stimate mediante il test del χ^2 , applicando la correzione per piccoli campioni proposta da Levene (1949). Dati i campioni relativamente piccoli, nel caso di loci con più alleli i test sono stati effettuati anche cumulando gli alleli meno comuni (Sokal & Rohlf, 1969). In alcuni casi sono state anche calcolate le probabilità esatte di significatività mediante il test di Fisher (1954).

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di variabilità genetica: a) eterozigosi media attesa per locus (H_e), calcolata come proporzione media di genotipi eterozigoti attesi in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, rispetto al numero totale di individui. Per ogni locus, se x_i è la frequenza dell'allele i -esimo nella popolazione, l'eterozigosi media attesa (h_e) è data da: $h_e = 1 - \sum x_i^2$, dove la sommatoria è calcolata su tutti gli alleli presenti. L'eterozigosi media attesa (H_e) su un campione di N loci è data dalla media dei valori di h_e , ossia: $H_e = \sum h_e / N$. Nel caso di piccoli campioni, un analogo parametro, qui indicato come H_{e*} , (Nei, 1978), è basato sulle frequenze genotipiche attese calcolate con la correzione di Levene (1949); b) proporzione di loci polimorfici (P), data da: $P = N \text{ loci polimorfici} / N \text{ totale di loci}$. Sono stati utilizzati due criteri di polimorfismo, che considerano un locus polimorfico se la frequenza dell'allele più comune è rispettivamente $\leq 0,99$ (P_{99}) oppure $\leq 0,95$ (P_{95}). Il primo è generalmente il più usato, ma risente maggiormente della dimensione del campione (Nei, 1978); c) numero medio di alleli per locus (A), dato da: $A = N \text{ totale di alleli} / N \text{ totale di loci}$. Questo parametro dipende molto più degli altri dalle dimensioni del campione, poiché generalmente nelle popolazioni naturali vi sono molti alleli a bassa frequenza (tra 0,01 e 0,05), che possono non essere osservati in

campioni piccoli. Questi alleli contribuiscono in scarsa misura alla stima dell'eterozigosi (Nei, 1987).

Per flusso genico si intende il movimento di geni da una popolazione ad un'altra (generalmente conspecifica), che può essere causato da meccanismi diversi: 1) migrazione di individui; 2) movimento di gameti; 3) estinzione e ricolonizzazione di intere popolazioni; 4) movimento di trasposoni e di segmenti extranucleari di DNA, quali mitocondri, plasmidi e virus. Vi sono opinioni discordi sul ruolo evolutivo del flusso genico, legate in gran parte alle difficoltà di misurare questo parametro (Mayr, 1942, 1963; Ehrlich & Raven, 1969; Endler, 1977; Stanley, 1979; Slatkin, 1985a). Su base teorica, Wright (1931) ha dimostrato che se una frazione m di individui di una popolazione è sostituita da migranti, in assenza di selezione non vi sarà differenziamento genetico significativo se $Nm > 1$, dove N è la dimensione effettiva della popolazione (l'autore ipotizza in questo caso un modello di struttura di popolazione a "isole", in cui ogni popolazione è equivalente a tutte le altre e ha la stessa probabilità di ricevere e inviare migranti da e a ognuna di queste). Una stima quantitativa di Nm può essere ottenuta a partire dai valori di F_{ST} , calcolati per coppie di popolazioni secondo Weir e Cockerham (1984), utilizzando i programmi GENETIX 4.02 (Belkhir *et al.*, 2000) e GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset, 1995).

La divergenza genetica tra le popolazioni studiate è stata quantificata utilizzando gli indici di identità (I_{Nei}) e distanza (D_{Nei}) genetica standard secondo Nei (1972 e 1978): se consideriamo due popolazioni, X e Y, in cui più alleli segregano ad un dato locus, indicando con x_i e y_i le frequenze dell'allele i -esimo rispettivamente in X e Y, la probabilità che alleli presi a caso all'interno di ciascuna popolazione siano

uguali è rispettivamente: $j_X = \sum_{i=1}^n x_i^2$ nella popolazione X, $j_Y = \sum_{i=1}^n y_i^2$ nella popolazione Y. La probabilità che siano uguali due alleli presi a caso in ciascuna

delle due popolazioni è invece: $j_{XY} = \sum_{i=1}^n x_i y_i$. Le sommatorie sono effettuate su tutti gli alleli presenti al locus considerato. Se le mutazioni nucleotidiche sono

indipendenti, l'identità genetica media standard è data dalla formula: $I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$ dove J_X , J_Y e J_{XY} rappresentano le medie aritmetiche di j_X , j_Y e j_{XY} calcolate su tutti i loci studiati (inclusi i monomorfici). La distanza genetica media standard è invece: $D = -\log_e I$. I valori di I variano da 0, quando le due popolazioni non hanno nessun allele in comune, a 1, quando presentano frequenze alleliche identiche a tutti i loci; in corrispondenza D varia da 0 a ∞ . D rappresenta una stima del numero medio di sostituzioni alleliche, evidenziabili elettrofereticamente, accumulate nel genoma dal momento in cui le due popolazioni hanno cominciato a divergere. Questo parametro risulta proporzionale al tempo di divergenza evolutivo. Per piccoli valori di distanza genetica ($D < 1$), e assumendo un tasso costante di sostituzioni aminoacidiche per le varie proteine, la distanza genetica secondo Nei (1972) risulta correlabile al tempo di divergenza tramite una relazione lineare. Nei (1975) ha proposto la seguente formula:

$t = -\frac{D}{2cn\lambda}$ dove t rappresenta il tempo relativo all'inizio dell'isolamento fra le due popolazioni ancestrali, in seguito al quale si sarebbe verificata la loro evoluzione indipendente; c = proporzione di sostituzioni amminoacidiche riconoscibili elettroforeticamente; n = numero medio di amminoacidi per proteina, λ = tasso di sostituzione amminoacidica per sito per anno. Il valore di $cn\lambda = \alpha$ ed è $\approx 10^{-7}$ (Nei, 1972). Per ottenere una stima approssimativa della reazione lineare intercorrente tra distanza genetica e tempo di evoluzione è possibile utilizzare la formula $t = 5 \cdot 10^6 D$ (Nei, 1975).

Le relazioni di affinità genetica tra popolazioni e specie studiate sono state rappresentate mediante dendrogrammi bidimensionali, ottenuti con il metodo UPGMA, o delle medie non pesate (*unweighted pair-group method*, Sneath & Sokal, 1973), e mediante Unrooted Neighbour Joining Trees a partire dalle matrici di distanza genetica calcolate con la formule di Nei (1972).

CAPITOLO 2

RICERCHE SULLA GERMINAZIONE *IN VITRO* E SULLA STRUTTURA GENETICA DI TAXA DEL GENERE *SANTOLINA*

2.1. Introduzione

Il genere *Santolina* L., 1753 appartiene alla famiglia Asteraceae, ordine Asterales. Le asteracee sono una delle più grandi famiglie di angiosperme, annoverando circa 1'100 generi e 25'000 specie (Jeffrey, 1978). Il genere *Santolina* appartiene alla tribù Anthemideae, che comprende 111 generi e circa 1'800 specie distribuite in tutto il mondo ma principalmente in Asia centrale, nella regione mediterranea e in sud Africa (Oberprieler *et al.* 2006).

Le santoline sono piante perenni con odore forte, spesso sgradevole, legnose alla base, ramosissime, cespugliose, alte 20-60 cm, a rami virgati semplici o strettamente ramoso-corimbosi, spesso munite di fascetti di foglie ascellari. Le foglie, alterne, sono a contorno lineare stretto, pettinato-dentate o pettinato-pennate, carnosette, a rachide lineare a denti o lacinie cilindriche o subclavate, in 2-6 serie. Peduncoli lungamente nudi, monocefali. Le infiorescenze (capolini) sono medio-piccole, peduncolate e circondate da varie serie di brattee involucrali, che aumentano in lunghezza gradualmente verso l'interno. Il ricettacolo è leggermente convesso e le squame circondano a metà gli acheni. I fiori sono tubulari, generalmente tutti ermafroditi, da giallo a biancastro. Il tubo è spesso compresso e più o meno alato, con sperone alla base o saccato e richiude l'apice del frutto. Gli acheni sono oblunghi, leggermente da 3- a 4(-5)-angolati; il pappo è assente.

Alcune specie di *Santolina* vengono o venivano usate nella medicina popolare in quanto contengono metaboliti secondari farmacologicamente attivi con proprietà anti-infiammatorie, antielmintiche, antitumoriche, antibatteriche e antivirali (Lodi, 1957; Corsi *et al.*, 1980; Ballero e Fresu, 1991; Flamini *et al.*, 1994; Senatore e De Feo, 1994; Ballero *et al.*, 1995; Silván *et al.*, 1996; Poli *et al.*, 1997; Suresh *et al.*, 1997; De Logu *et al.*, 2000).

La distribuzione geografica del genere *Santolina* è limitata all'Europa sud-occidentale e al Maghreb; il genere è presente con uno o più taxa in Portogallo, Spagna, isole Baleari, Francia meridionale, Corsica, Sardegna, alcuni tratti della fascia costiera tirrenica della penisola italiana, dalla Liguria orientale alla penisola sorrentina (Campania), Marocco, Tunisia e Algeria (Greuter, 2008). Vi sono tuttavia specie e varietà coltivate, presenti in vari paesi europei ed extraeuropei, talora inselvatichite, come vedremo in seguito.

La sistematica del genere *Santolina* ha subito numerose revisioni e anche oggi la situazione è ancora in stato di flusso. Limitandoci ad alcuni dei lavori più recenti (Guinea, 1970; Arrigoni, 1979; Guinea e Tutin, 1993; Greuter, 2008) si può vedere che specie, sottospecie e varietà della monografia di Guinea (1970) non sono ritenute valide o hanno cambiato rango tassonomico nella Flora Europaeae (Guinea e Tutin, 1993); altri cambiamenti sostanziali sono stati introdotti da Arrigoni (1979) e da Greuter (2008). Uno dei punti più controversi è rappresentato dal significato sistematico e dalla utilizzabilità del binomio *S. chamaecyparissus* L., 1753. Come hanno fatto rilevare Lacaita (1925), Marchi e D'Amato (1973) e Arrigoni (1979), è difficile attribuire il tipo linneano a una delle specie di *Santolina* conosciute poiché sfortunatamente esso non offre caratteri diagnostici importanti, quali le foglie dei getti sterili e il colore dei fiori. La descrizione che Linneo (1753) fa di *S. chamaecyparissus* è molto breve: “*Santolina pedunculis unifloris foliis quadrifariam dentatis*” e l'indicazione dell'origine geografica è vaga: “Habitat in Europa australis”. Linneo (1753) rinvia a suoi precedenti lavori, nei quali l'origine geografica di *S. chamaecyparissus* è indicata con più precisione: “Hetruriae, Hispaniae, Galliae Narbonensis” (1737, 1748), poi estesa alla “Campania” (1749). L'indicazione ‘Europa australe’ del 1753 rappresenta, quindi, un'estensione di quelle dei precedenti lavori. E' da ritenere che Linneo volesse inserire in *S. chamaecyparissus* varie entità già distinte da Clusius (1601), Theophrastus (1644) e Tournefort (1700). Infatti i tre esemplari linneani custoditi nel British Museum sono vistosamente eterogenei e anch'essi mancano di indicazioni dell'origine geografica. Secondo Juel (in Lacaita, 1925), *S. chamaecyparissus* esisteva nel giardino botanico di Uppsala ai tempi di

Linneo; è possibile, quindi, non esistendo alcuna specie spontanea di *Santolina* nei paesi scandinavi, che il materiale linneano che ci è giunto provenga da piante coltivate.

Nelle flore di Francia (Grenier e Godron, 1850; Rouy, 1903; Coste, 1903) *S. chamaecyparissus* L. è identificato con *S. incana* Lamarck (1778), probabilmente seguendo un'interpretazione di De Candolle (1815, 1837). Tale interpretazione è tuttavia certamente errata, dal momento che secondo lo stesso Lamarck (1778) *S. chamaecyparissus* L. (= *S. cupressiformis* Lamarck) è specie chiaramente distinta da *S. incana*, che differisce dal tipo linneano per la tomentosità e lo sviluppo dei lobi delle foglie. Poiret (1804) ritiene di aver osservato *S. chamaecyparissus* nei dintorni di Aix en Provence. Vi sono in effetti, secondo Arrigoni (1979), notevoli somiglianze tra *S. provincialis* Jord. & Fourr., 1869 ed altre santoline della Francia meridionale con il tipo linneano. Come osservato da Lacaita (1925) è impossibile, tuttavia, stabilire con certezza l'identità del tipo linneano con popolazioni di *Santolina* di qualsivoglia origine geografica.

Nonostante tali fatti, il binomio *S. chamaecyparissus* è stato ed è tuttora usato da numerosi botanici per designare specie di *Santolina* (o per riunire varietà e sottospecie più o meno distinte).

Un altro aspetto da considerare è l'esistenza nel genere *Santolina* di piante ornamentali coltivate, in genere di origine ibrida, di cui la più diffusa viene indicata proprio con il binomio *S. chamaecyparissus*. E' anche possibile, come si è detto, che il tipo di Linneo derivi da un esemplare coltivato (Juel in Lacaita, 1925). Greuter (2008), che sinonimizza *S. marchii* Arrigoni, diffusissimo allopoliploide coltivato in Italia e all'estero, con *S. chamaecyparissus* L., sembrerebbe accettare questa interpretazione.

La struttura cariologica di *S. marchii* è stata descritta da Marchi e D'Amato (1973) e nella presente tesi vengono riportati i primi dati sul genotipo multilocus di due campioni di *S. marchii*, provenienti rispettivamente dall'Italia e dalla Francia. Sono, tuttavia, necessarie ulteriori ricerche sulla genetica delle varie cultivar e varietà di *S. chamaecyparissus*, coltivate in diversi paesi europei ed extra-europei (Sud

Africa, Australia, Stati Uniti, ecc.), per stabilire se siano attribuibili ad un'unica specie, o piuttosto ad un insieme eterogeneo di biotipi e cloni.

Da tempo, infine, è stata segnalata l'esistenza di *S. chamaecyparissus* del tipo coltivato, inselvatichita e/o naturalizzato in varie località d'Italia, Francia, penisola iberica, Balcani e di altri paesi europei. Queste piante sono vigorose e capaci di adattarsi ad ambienti diversi, anche se le loro capacità di diffusione appaiono limitate. L'esistenza di *S. chamaecyparissus* del tipo coltivato, inselvatichito o naturalizzato in vari paesi, ha spesso reso incerta l'individuazione e la corretta classificazione di specie spontanee di *Santolina* e ha più volte causato dubbi nella delimitazione del loro areale.

Persistendo tali incertezze, da molto tempo causa non eliminabile di errori e confusioni, il binomio *Santolina chamaecyparissus* L. andrebbe rigettato ai termini dell'art. 69 del Codice di Nomenclatura Botanica (Arrigoni, 1979).

Nella presente tesi le santoline pentaploidi, sterili, a riproduzione vegetativa, sia coltivate che inselvatichite, abitualmente attribuite a *S. chamaecyparissus*, vengono indicate sempre come *S. marchii*. Inoltre *S. chamaecyparissus* subsp. *tomentosa* (Pers.) Arcangeli, 1882, nome ancora oggi usato abitualmente da botanici francesi e spagnoli, viene sinonimizzato con *S. benthamiana* Jord. et Fourr., 1869 (Greuter, 2008).

Nel genere *Santolina* sembra vadano incluse le ventiquattro specie elencate con le principali sinonimie e con il loro areale nella Tab. 11 (Greuter, 2008, mod.).

Tab. 11. Specie del genere *Santolina* in ordine alfabetico e loro areale (Greuter, 2008, mod.).

- S. adscensionis* Maire (1935). Marocco.
- S. africana* Jord. et Fourr. (1869). Maghreb.
- S. ageratifolia* Asso (1784). Spagna.
- S. benthamiana* Jord. et Fourr. (1869) = *S. chamaecyparissus* subsp. *tomentosa* (Pers.) Arcangeli (1882). Spagna, Pirenei.
- S. canescens* Lag. (1816) = *S. rosmarinifolia* subsp. *canescens* (Lag.) Nyman (1851). Spagna meridionale.
- S. corsica* Jord. et Fourr. (1869). Corsica e Sardegna centro-settentrionale.
- S. decumbens* Mill. (1768) = *S. chamaecyparissus* subsp. *incana* (Lam.) Guinea (1970) = *S. cupressiformis* Lam. (1779). Spagna, Francia meridionale.
- S. elegans* DC (1838). Spagna meridionale.
- S. etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato (1973). Italia centrale (Toscana, Lazio e marginalmente Umbria).
- S. impressa* Hoffmanns. et Link (1834). Portogallo.
- S. insularis* (Gennari ex Fiori) Arrigoni (1979) = *S. chamaecyparissus* subsp. *insularis* (Gennari ex Fiori) Yeo (1975). Sardegna centro-meridionale.
- S. ligustica* Arrigoni (1977). Liguria orientale (Italia).
- S. magonica* (O. Bolòs *et al.*) Romo (1994) = *S. chamaecyparissus* subsp. *magonica* O. Bolòs *et al.* (1987 [1988]). Isole Baleari.
- S. marchii* Arrigoni (1977) = *S. chamaecyparissus* L. (1753): nome non utilizzabile (Arrigoni, 1979)
- S. melidensis* (Rodr. Oubiña et S. Ortiz) Rodr. Oubiña et S. Ortiz (1998) = *S. rosmarinifolia* subsp. *melidensis* Rodr. Oubiña et S. Ortiz (1993). Spagna.
- S. neapolitana* Jord. et Fourr. (1869) = *S. pinnata* subsp. *neapolitana* (Jord. Et Fourr.) C. Jeffrey (1980). Penisola sorrentina, Campania (Italia).
- S. oblongifolia* Boiss. (1856). Spagna centrale.
- S. pectinata* Lag. (1816) = *S. chamaecyparissus* subsp. *pectinata* (Lag.) Bonnier et Layens (1894) = *S. rosmarinifolia* subsp. *pectinata* (Lag.) Maire (1934). Spagna meridionale, Algeria, Marocco.
- S. pinnata* Viv. (1802) = *S. leucantha* Bertoloni (1819). Alpi Apuane, Toscana (Italia).
- S. rosmarinifolia* L. (1753). Spagna, Portogallo.
- S. semidentata* Hoffmanns. et Link (1834) = *S. rosmarinifolia* subsp. *semidentata* (Hoffmanns. et Link) Valdés Berm. (1981) = *S. rosmarinifolia* var. *pectinata* (Lag.) Coutinho (1939). Spagna, Portogallo.
- S. villosa* Mill. (1768) = *S. chamaecyparissus* subsp. *squarrosa* (DC) Nyman 1879. Spagna, Francia meridionale.
- S. virens* Mill. (1768) = *S. chamaecyparissus* subsp. *viridis* Rouy (1882). Spagna, Francia meridionale.
- S. viscosa* Lag. (1816). Spagna meridionale.

2.2. Specie studiate

***Santolina pinnata* Viviani 1802 (= *S. leucantha* Bertoloni 1819)**

S. pinnata (Fig. 1) è una camefita fruticosa; è una pianta cespugliosa a fusto legnoso ingrossato alla base e raggiunge i 10-30 cm di altezza. E' glabra, con rami fioriferi nudi all'apice. Foglie lineari (1-3.5 cm), pinnate a lacinie sottili (2-4 mm) su 2-4 file; picciolo evidente (3-8 cm) allargato alla base. Capolini sferici piccoli (5-8 mm di diametro) con squame involucrali carenate, leggermente scariose all'apice; brattee interfiorali (pagliette) acute o mucronulate. Il fiore ha corolla biancastra con lacinie triangolari acute (Arrigoni, 1982a; Fig. 2).

S. pinnata è un endemismo delle Alpi Apuane (Toscana nord-occidentale, Fig. 3) dove vive su pendii calcarei, su marmi frantumati in detriti o fessurati in roccioni quasi nudi e in prati soleggiati, tra i 500 e i 1'500 m di altitudine (Ferrarini, 1967; Barbero e Bono, 1973; Arrigoni, 1982a; Garbari e Bechi, 1992; Bechi *et al.*, 1996; Ansaldi *et al.*, 2009; Fig. 4, 5).

E' specie ben distinta morfologicamente dalle altre specie italiane, in particolare per l'assenza di peli, i rami nudi nella parte superiore e unifiorali e per il colore del fiore bianco (Arrigoni, 1979).

E' specie diploide, con $2n = 18$ (Martinoli, 1939; Marchi e D'Amato, 1973).

***Santolina ligustica* Arrigoni 1977**

S. ligustica (Fig. 6) è una nanofanerofita (camefita); è una pianta cespugliosa, legnosa alla base, gracile e raggiunge i 10-30 cm di altezza. E' di colore cenerino-puberula, salvo le foglie primordiali glabre e verdi. Getti fertili di 15-25 cm, ramosi in alto e terminanti in un corimbo di capolini. Foglie lineari di 1-4 cm, a lacinie gracili (2-4 mm), su 2-4 file; picciolo sottile lungo 4-8 (fino a 12) mm (Fig. 7). Capolini piccoli (4-6 mm di diametro) con brattee involucrali farinoso-pubescenti, scarioso-lanose al margine; le brattee interfiorali sono pubescenti in alto e arrotondate al margine superiore. La corolla è bianca a lobi triangolari acuti e tubo sottile (Arrigoni, 1977, 1982a). La corolla è del tutto simile in *S. ligustica*, *S. etrusca*

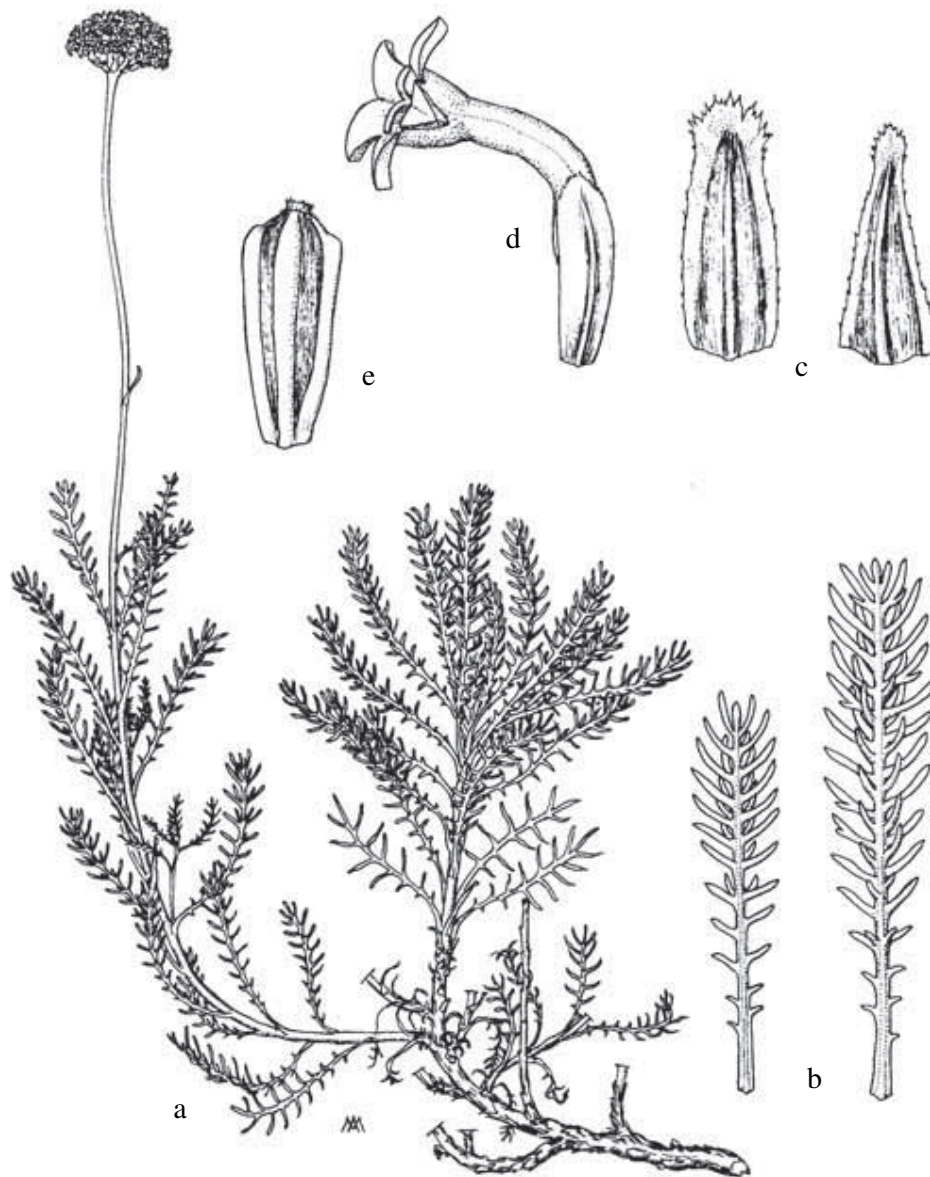


Fig. 1. *Santolina pinnata*: (a) habitus; (b) foglie; (c); (d) fiore; (e) seme (da Ansaldi *et al.*, 2009).

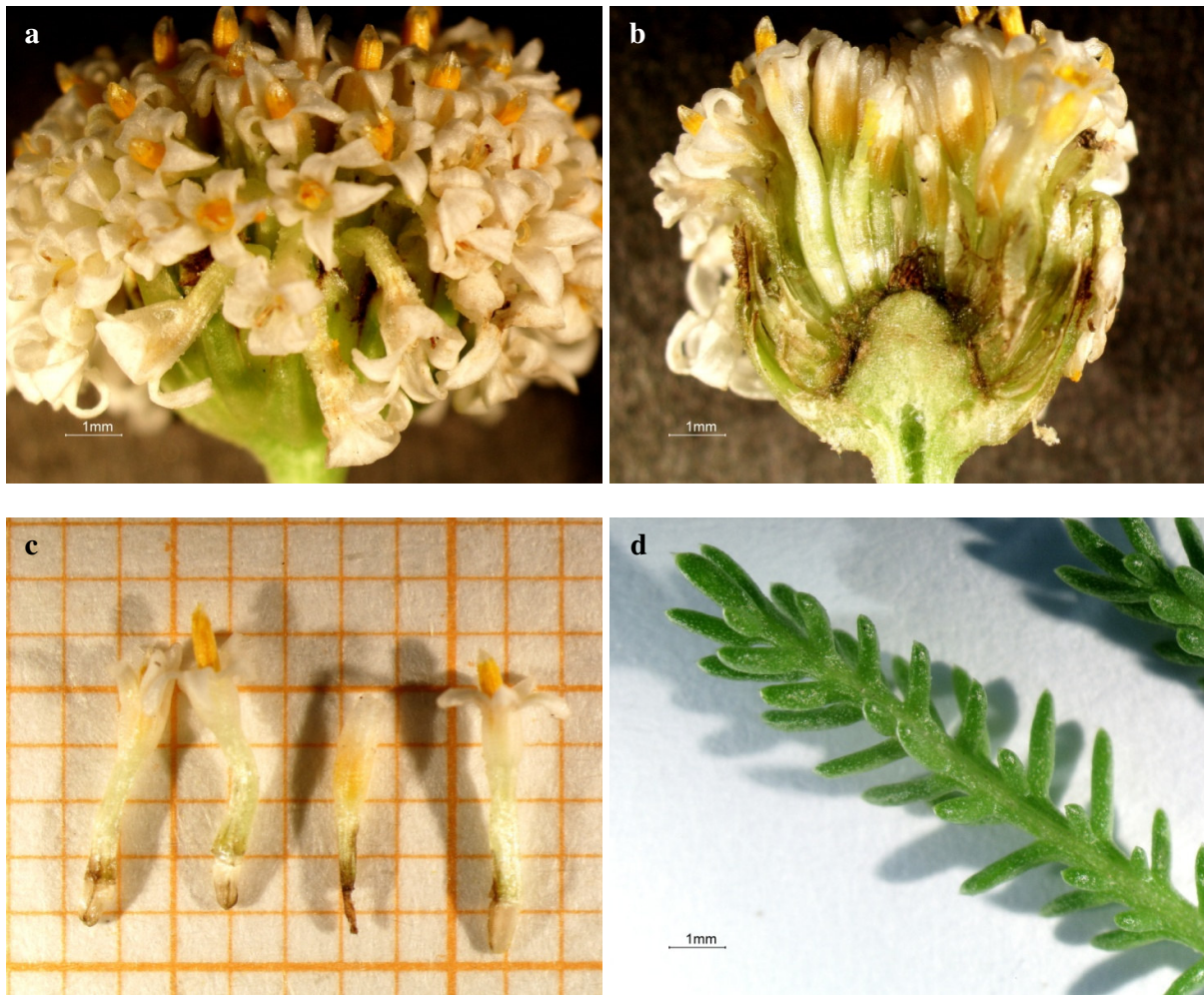


Fig. 2. *Santolina pinnata*: (a) capolino (0,8 x) (b) capolino (sezione) (0,8 x) (c) fiori (0,8 x) (d) foglia dei getti sterili (0,8 x). (Foto: C. Olmati).

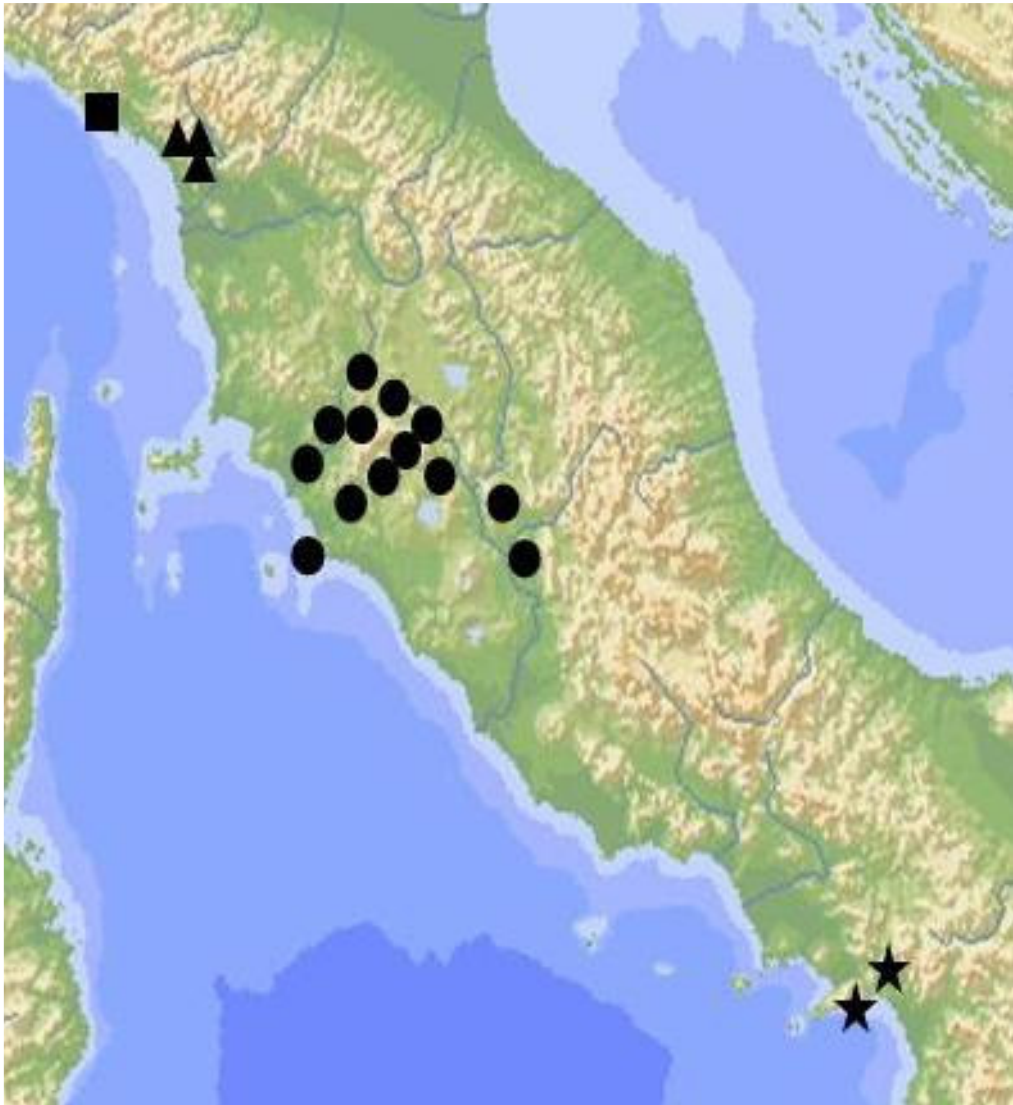


Fig. 3. Origine geografica delle popolazioni attuali dei taxa italiani diploidi del genere *Santolina* : *S. ligustica* (■); *S. pinnata* (▲); *S. etrusca* (●); *S. neapolitana* (★).



Fig. 4. Rocce calcaree affioranti in un pendio presso Pian della Fioba, Alpi Apuane; in questa stazione cresce l'endemismo apuano *Santolina pinnata* (Foto C. Olmati).



Fig. 5. *Santolina pinnata*: (a) pianta isolata; (b) pianta isolata in fiore (Foto: C. Olmati).

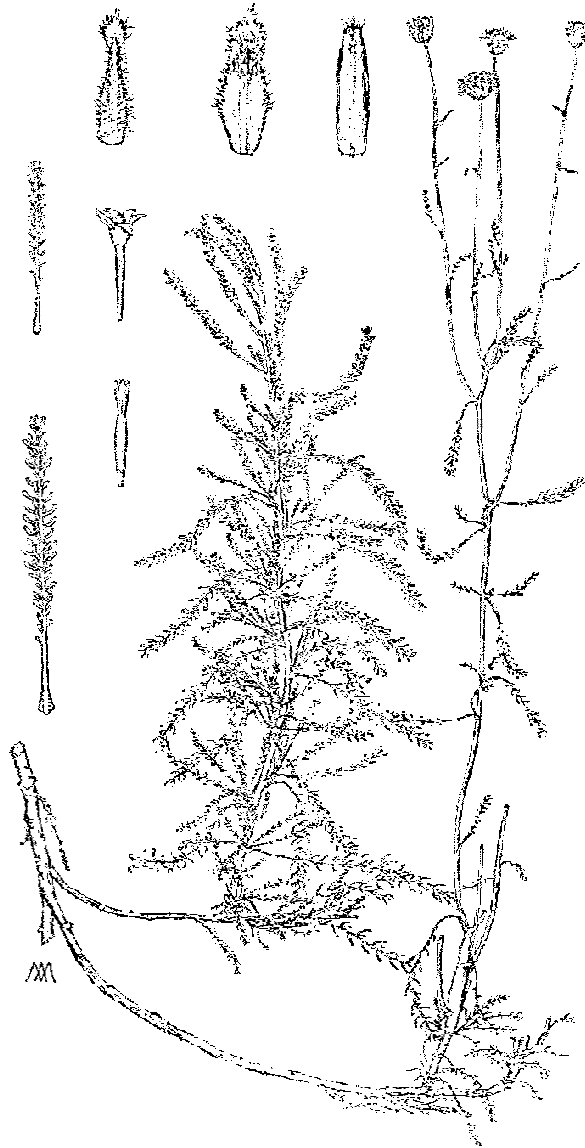


Fig. 6. *Santolina ligustica* Arrigoni (da Arrigoni, 1977)

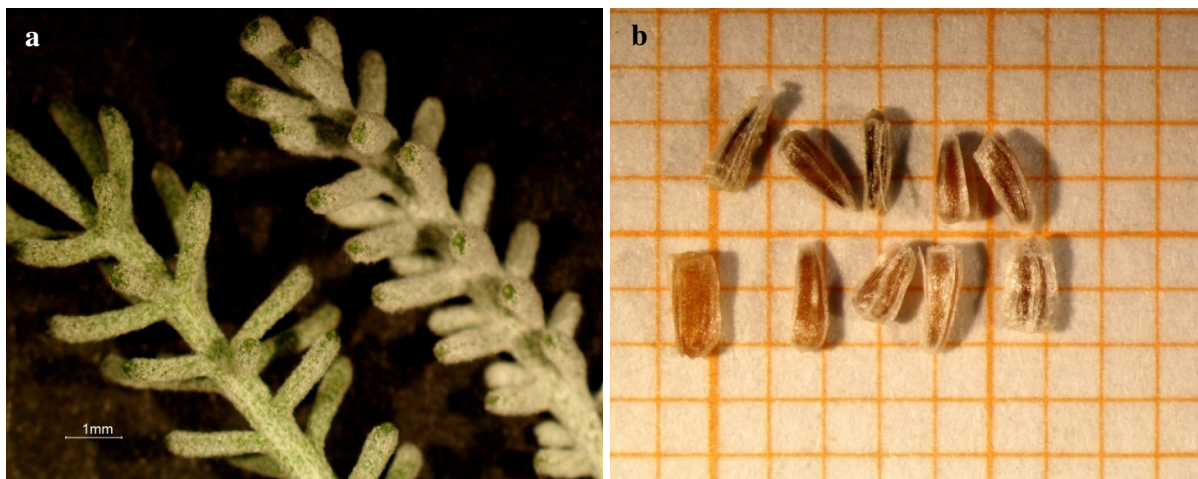


Fig. 7. *Santolina ligustica*: (a) foglie dei getti sterili (0,8×); (b): semi (0,8 ×). (Foto: C. Olmati).

e *S. neapolitana*. Quanto al suo colore, in *S. ligustica* viene definito bianchiccio da Brilli Cattarini (1976), mentre Fiori (1925) dà fiori gialli come in *S. neapolitana* (ma probabilmente sbaglia confondendola con quest'ultima), mentre quelli di *S. etrusca* sarebbero cedrino-pallidi.

S. ligustica vive su suoli ofiolitici erosi e degradati, con elevato contenuto di magnesio, aridi o semiaridi, in ambienti aperti e soleggiati (Arrigoni, 1982a; Mariotti, 1982; Torricelli *et al.*, 1999; Fig. 8, 9). Vive nell'ambiente di gariga e scompare quando questo viene invaso da arbusti nel processo di successione; per tale motivo è più abbondante ai bordi dei sentieri (diradati artificialmente); è danneggiata dagli incendi, almeno nel breve termine, che causano forti fluttuazioni nel numero degli individui; in aree idonee ma antropizzate e, in situazioni meno favorevoli, tende ad essere sostituita da *Helichrysum italicum* (Torricelli *et al.*, 1999).

S. ligustica è un taxon proprio della Liguria orientale, con un areale relitto in via di continua, progressiva riduzione. Fino ad alcuni decenni fa si trovava da Sestri Levante a Riomaggiore; nel 1999 Torricelli *et al.* lo davano da Masso, presso Castiglione Chiavarese (stazione disgiunta con un centinaio di individui), alla Valle del torrente Fegina, presso Monterosso al Mare. La specie è presente fino alla quota di 750 m (Monte Guaitarola). In Fig. 10 è illustrata la distribuzione attuale di *S. ligustica* (Torricelli *et al.*, 1999, mod.).

Torricelli *et al.* (1999) hanno realizzato stime della superficie dell'areale attuale (non più di 60 km²), della superficie effettivamente occupata dalla specie (4,6 km² contro i circa 12 precedenti) e della dimensione della popolazione (circa 30'000 individui). I dati analitici di tale ricerca sono riportati in Tab. 12 (Torricelli *et al.*, 1999).

S. ligustica è un taxon minacciato di estinzione (Conti *et al.*, 1992; Torricelli *et al.*, 1999). Nonostante l'istituzione del Parco Nazionale delle Cinque Terre nel 1999, la costruzione di strade e ville continua a ridurre anno dopo anno la superficie dell'areale e il numero degli individui.

La specie è stata tipificata da Arrigoni (1977) su campioni di Deiva Marina, tra Piazza e Castagnola.



Fig. 8. Sentiero nei pressi di Levanto (Liguria orientale) dove cresce *Santolina ligustica* (Foto: C. Olmati).

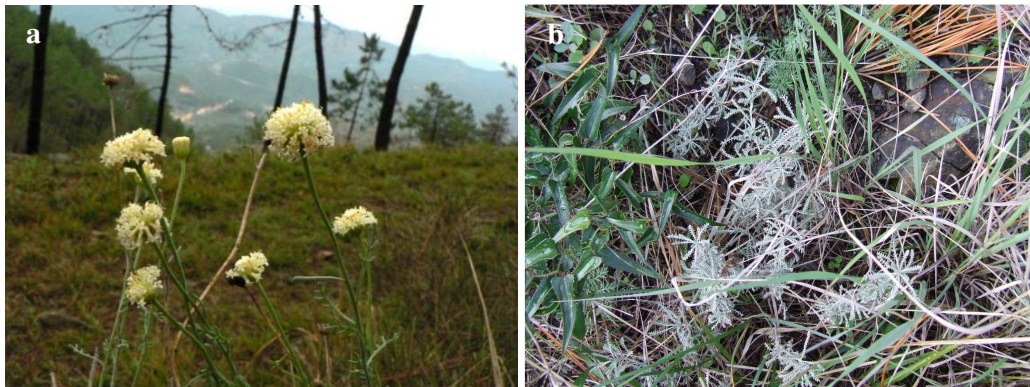


Fig. 9. *Santolina ligustica*, endemismo della Liguria orientale. (a) infiorescenze; (b): individui circondati da altre specie vegetali che competono con successo per la luce (Foto: C. Olmati).

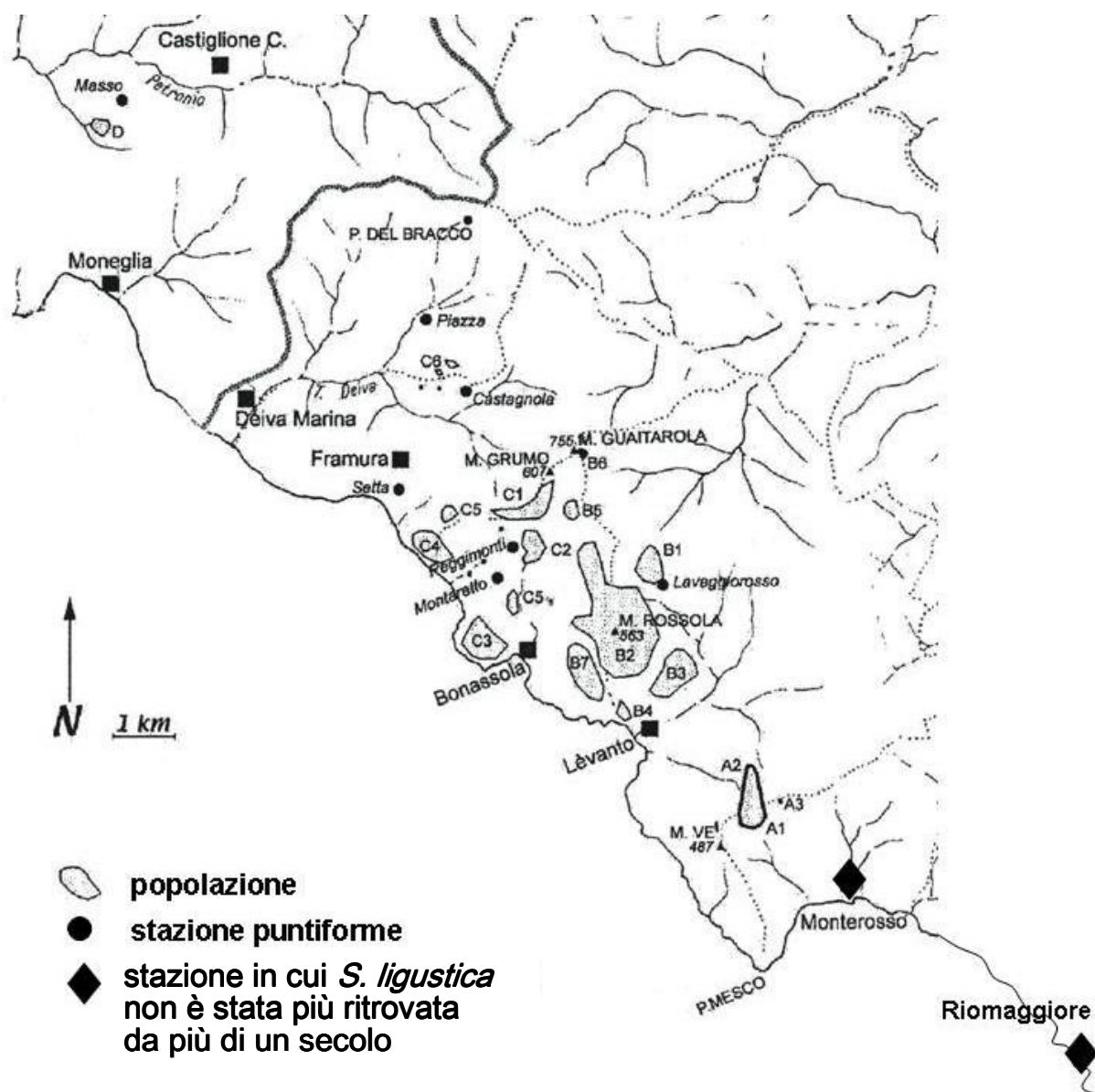


Fig. 10. Distribuzione attuale del taxon endemico della Liguria orientale *Santolina ligustica* (popolazioni: ; stazioni puntiformi: stazioni in cui la specie non è stata più ritrovata da più di un secolo (da Torricelli *et al.*, 1999, modificato).

Tab. 12. *Santolina ligustica*: superficie delle stazioni in km² e ripartizione della superficie delle stesse in base all'abbondanza della specie. La dimensione delle popolazioni è data in numero stimato di individui per stazione (da Torricelli *et al.*, 1999, modificato).

Sigla	Stazione	Superficie complessiva	Superficie di ciascuna stazione in cui la specie è:				Individui presenti
			abbondante	frequente	sporadica	rara	
A1	Bagari	0.1328	0	0.0782	0.0546	0	2110
A2	Cantarana	0.1812	0	0	0.0660	0.1152	775
B1	Lavaggiorosso	0.1366	0	0	0.0558	0.0808	639
B2	Rossola	1.1160	0.0200	0.2310	0.4580	0.4070	10407
B3	Streghe	0.5145	0	0.2200	0	0.2945	4695
B4	La Guardia	0.0752	0	0.0120	0.0632	0	872
B5	Colletto	0.2210	0	0.1420	0.0690	0.0100	3540
B6	Guaitarola	0.0060	0	0	0.0060	0	60
B7	Scernio	0.2024	0	0.0260	0.0504	0.0126	1150
C1	Grumo	0.1366	0.0030	0.0440	0.0896	0	1896
C2	Brino	0.0915	0	0	0.0415	0.0500	465
C3	Salto della Lepre	0.2224	0	0	0.0902	0.1322	1034
C4	Vandareccia	0.1835	0.0010	0.0308	0.1517	0	2173
C5	Foce	0.0780	0	0	0	0.0780	78
C6	Passano	0.3700	0	0	0.0900	0.2800	118
D1	Masso	0.3000	0	0	0.1000	0.2000	120
	Totale	4.6697	0.0240	0.7900	1.2090	3.0191	30182

S. ligustica è specie diploide, con $2n = 18$ (Arrigoni, 1977).

***Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato 1973**

S. etrusca è una nanofanerofita; è una pianta cespugliosa, robusta, ramosa e raggiunge i 20-40 cm di altezza. I getti sterili sono di colore cinerino mentre quelli fertili giallo-olivastro. Foglie lineari, allungate, a lacinie sottili, brevi 1,5-2,5 mm. Capolini di 7-10 mm di diametro, con brattee involucrali furfuraceo-pubescenti e scariose al margine; brattee interfiorali lanose in alto e arrotondate al margine superiore (Fig. 11). La corolla è giallo citrino (Arrigoni, 1982a), a lobi triangolari acuti e tubo sottile.

S. etrusca vive prevalentemente lungo i corsi d'acqua (Figg. 12, 13) ed è legata a suoli alcalini, argillosi, marnosi o ciottolosi, ma si trova anche lungo le strade, in terreni incolti (Figg. 14, 15), in querceti degradati e soleggiati, fino a 800 m di altitudine (Marchi e D'Amato, 1973; Arrigoni, 1979, 1982a; Angiolini *et al.*, 1996; Angiolini e Boscagli, 1997; Angiolini, 2001; Angiolini *et al.*, 2005; Blasi *et al.*, 2010).

La specie è endemica di Toscana, Lazio e marginalmente dell'Umbria (Arrigoni, 1982a; Angiolini *et al.*, 2001; Figg. 3). Le stazioni di raccolta attuali e storiche (campioni di erbario di fine '800 e della prima metà del '900) sono mostrati nelle Figg. 16, 17.

S. etrusca è stata descritta per la prima volta da Lacaita (1925) per le sponde del fiume Orcia sotto Radicofani (*locus classicus*) come varietà *etrusca* di *S. chamaecyparissus*, unica specie in quel periodo segnalata per l'Italia. In base ad analisi cariologiche e considerazioni corologiche è stata elevata a rango specifico da Marchi e D'Amato nel 1973. La caratteristica morfologica principale che la differenzia dalle altre specie è il colore giallo-citrino dei fiori (Arrigoni, 1979). Secondo Brilli Cattarini (in Zangheri, 1976) la corolla è giallo-citrino pallido.

E' specie diploide, con $2n = 18$ (Marchi e D'Amato, 1973).

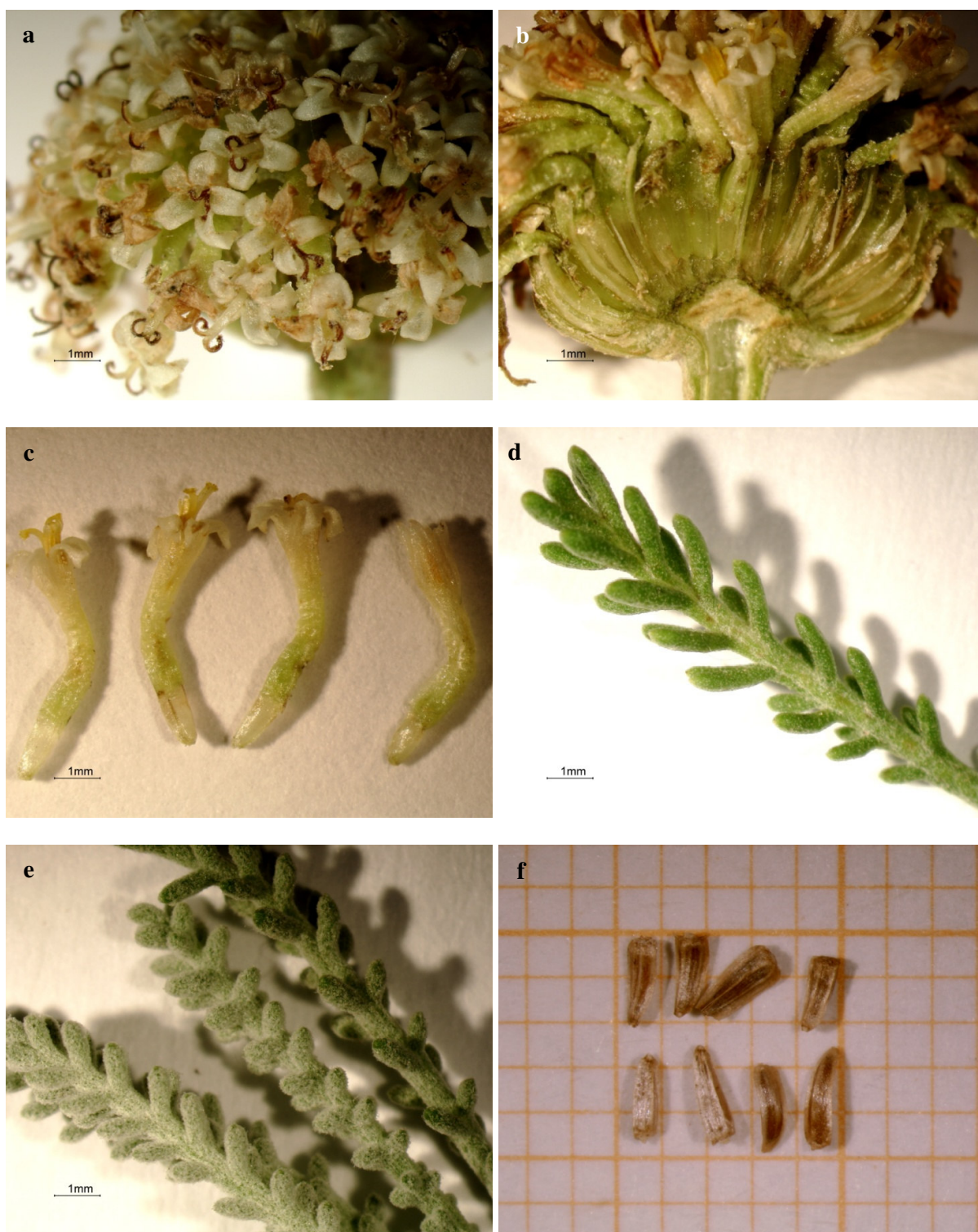


Fig. 11. *Santolina etrusca* : (a) capolino ($\times 0,8$); (b) capolino (sezione) ($\times 0,8$); (c) fiori ($\times 0,8$); (d) foglia giovane dei getti sterili ($\times 0,8$); (e) foglie dei getti sterili dell'anno precedente ($\times 0,8$); (f) semi ($\times 0,8$). (Foto: C. Olmati).



Fig. 12. Il fiume Orcia sotto Radicofani (Appennino senese); sulle rive sassose del fiume cresce *Santolina etrusca* (Foto: E.A. Olmati e C. Olmati).



Fig. 13. (a), (b): individui isolati di *Santolina etrusca* che crescono tra i ciottoli delle rive del fiume Orcia (Foto: E.A. Olmati e C. Olmati).



Fig. 14. Affioramento di travertino a Bassano Scalo (Bassano in Teverina, Lazio settentrionale); su queste rocce calcaree cresce *Santolina etrusca*, endemismo dell'Italia centrale tirrenica (Foto: E.A. Olmati e C. Olmati).



Fig. 15. (a), (b): piante in fiore di *Santolina etrusca*; in (b) primo piano di infiorescenze (Foto: C. Olmati).

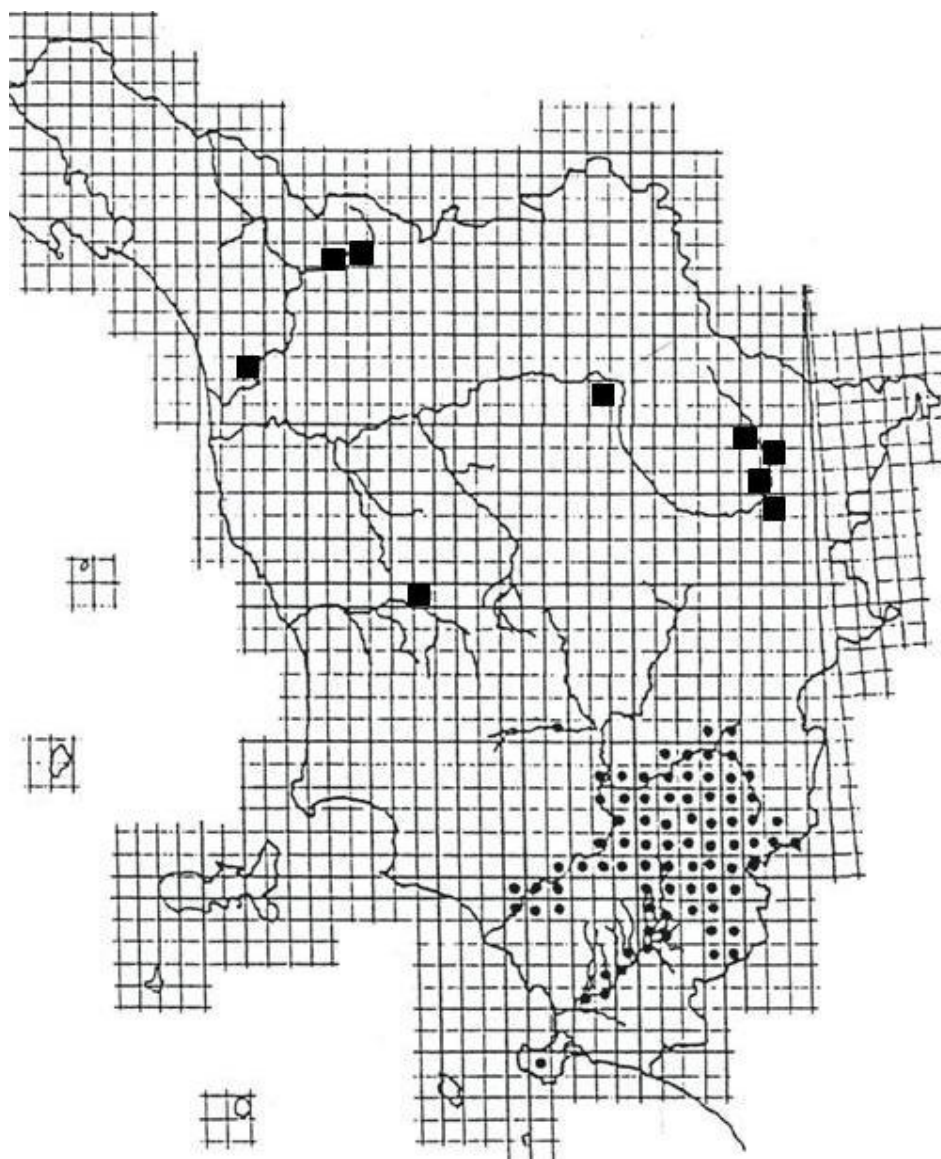


Fig. 16. Località della Toscana in cui è stata segnalata la presenza di *Santolina etrusca*: i cerchi indicano stazioni in cui la specie è ancor'oggi presente, mentre i quadrati si riferiscono a località in cui *S. etrusca* non è stata rinvenuta da più di un secolo (da Angiolini, 2001).

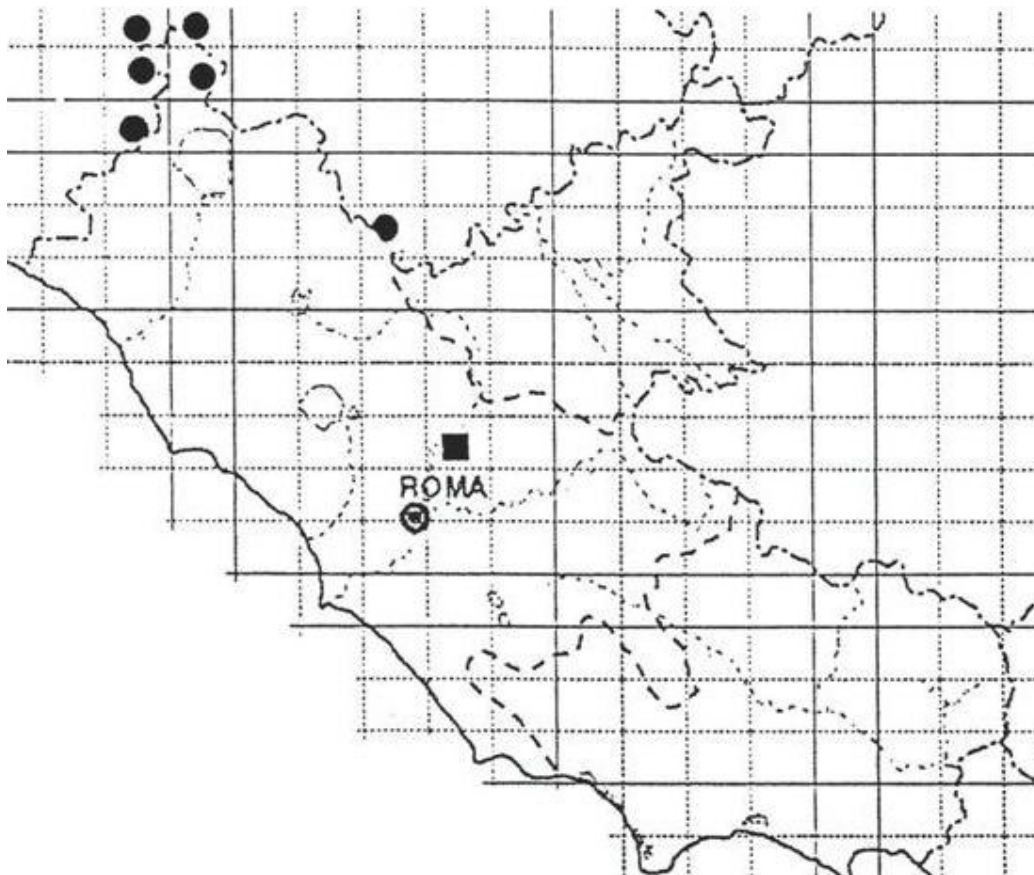


Fig. 17. Località del Lazio in cui è stata segnalata la presenza di *Santolina etrusca*: i cerchi indicano stazioni in cui la specie è ancor'oggi presente, mentre i quadrati si riferiscono a località in cui *S. etrusca* non è stata rinvenuta da più di cinquant'anni (da Angiolini, 2001).

***Santolina neapolitana* Jord. et Fourr. 1869**

S. neapolitana (Fig. 18) è una nanofanerofita; è una pianta cespuglioso-ramosa, cinerino-tomentosa salvo i getti giovani. Ha foglie picciolate, dimorfe; quelle dei getti fertili lunghe 1-3 cm a lacinie corte (fino a 4 mm), le altre più lunghe (2-6 mm), con lacinie lineari, sottili, fino a 6-7 mm (Fig. 19). Capolini emisferici di 7-12 cm di diametro, con brattee involucri allungate, spesso lacero-scariose al margine superiore; corolla giallo vivo a lobi triangolari acuti e tubo sottile (Arrigoni, 1982a). Secondo Brilli Cattarini (in Zangheri, 1976) la corolla è gialla più o meno vivo.

S. neapolitana cresce su substrati calcarei, su colli aridi e assolati, dal livello del mare fino circa 1'000 m (Arrigoni, 1982a; Figg. 20, 21).

E' specie endemica della penisola sorrentina (Monte Faito, Fiordo di Furore) e dei Monti Picentini (Vallone Matrunolo, Alta Valle del Sabato; Arrigoni, 1982a; Caputo *et al.*, 1989-1990; Caneva *et al.*, 2003; Fig. 3).

E' stata tipificata da Jordan e Fourreau (1869) su materiale proveniente da Castellammare di Stabia. Differisce dalle altre santoline italiane specialmente per avere i fiori di un giallo vivo e per il marcato sviluppo delle lacinie fogliari dei getti sterili (Arrigoni, 1979).

S. neapolitana è specie diploide, con $2n = 18$ (Marchi e D'Amato, 1973).

***Santolina insularis* (Genn. Ex Fiori) Arrigoni 1977**

Pianta canescente, cespuglioso-ramosa, robusta, raggiunge i 30-40 cm in altezza (Fig. 22). Foglie distintamente picciolate, quelle dei getti sterili più lunghe (3-6 cm) di quelle dei getti fertili (0,5-3 cm) con lacinie carnosette di 2-5 mm. Capolini emisferici, di diametro di 10-16 mm, con ricettacolo convesso, portati da peduncoli ingrossati in alto; brattee involucri farinose, scariose all'apice; pagliette rigide, crenate, glabre e mucronulate; corolla gialla, ben sviluppata, di circa 6 cm, con tubo dilatato in alto (Arrigoni, 1982a).

Vive in ambienti aridi e degradati, dai 100 ai 1'800 di quota, nella parte centro-meridionale della Sardegna. E' specie esaploide con $6x = 54$ (Marchi *et al.*, 1979).

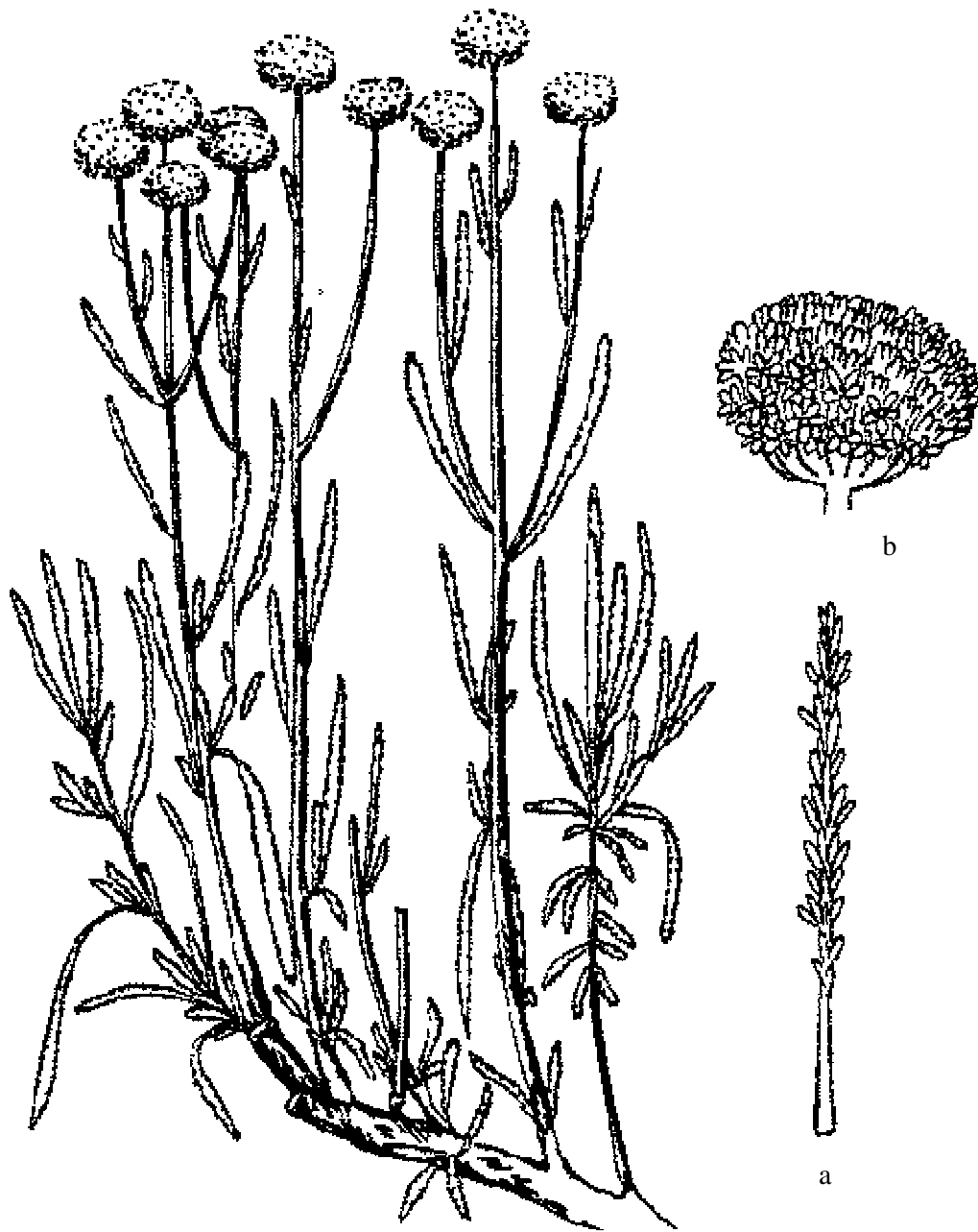


Fig. 18. *Santolina neapolitana*: (a) foglia; (b) capolino (da Pignatti, 1982).



Fig. 19. *Santolina neapolitana*: (a) foglie dei getti sterili (0,8×); (b) infruttescenza (0,8×); (c) semi (0,8×). (Foto: C. Olmati).



Fig. 20. Pendici del Monte Faito nella penisola sorrentina (Castellammare di Stabia, Campania); in questo biotopo vive l'endemismo *Santolina neapolitana* (Foto: U.A. Olmati).



Fig. 21. *Santolina neapolitana*: (a) cespuglio: (b) foglie e infruttescenze (Foto: U.A. Olmati).



Fig. 22. *Santolina insularis*, specie endemica esaploide della Sardegna centro-meri-dionale; (a) individui in coltivazione; (b) pianta vista dall'alto (Foto: C. Olmati).

***Santolina marchii* Arrigoni 1977**

Pianta cespuglioso-ramosa, cinerino-tomentosa, che raggiunge i 20-40 cm in altezza (Fig. 23). Foglie brevemente picciolate, corte in alto (1-2 cm) ed allungate (2-4 cm) in basso, a lacinie brevi (0,5-2 mm), ottuse, su 2-4 file. Capolini emisferici di 8-12 mm di diametro, con squame involucriali tomentoso-farinose ed a margine laceroscarioso; pagliette brevi, arrotondate e lanose al margine superiore. Fiori sterili a corolla gialla, di diametro di 5 mm circa, con lobi triangolari subacuti (Arrigoni, 1982a). Le antere sono perfettamente formate ma il polline è scarso e difforme (Marchi e D'Amato, 1973). *S. marchii* si differenzia da *S. insularis* per la sterilità, per le lacinie delle foglie dei getti sterili più corte, i capolini più piccoli, i piccioli più stretti e brevi e le squame interfiorali più piccole e pubescenti nella metà superiore (Arrigoni, 1977).

Specie coltivata, pentaploide ($5x = 45$; Marchi e D'Amato, 1973), a riproduzione esclusivamente vegetativa, diffusa sia in Europa che in paesi extra-europei.

Un progresso significativo nella caratterizzazione delle piante coltivate attribuite a *S. chamaecyparissus* è venuto dal lavoro di Marchi e D'Amato (1973). Le ricerche cariologiche di questi autori hanno individuato un biotipo pentaploide largamente diffuso in Italia (la prima pianta studiata proveniva dall'Orto Botanico di Pisa); tale biotipo, sterile e a riproduzione vegetativa, è caratterizzato da 7 coppie di cromosomi subtelocentrici. Arrigoni (1977) ha descritto il biotipo pentaploide osservato da Marchi e D'Amato (1973) come specie distinta, attribuendole il nome di *Santolina marchii*; nella diagnosi ne ha dato le caratteristiche morfologiche più salienti, confermando che si tratta di una pianta sterile, a riproduzione esclusivamente vegetativa. *S. marchii* è stata rinvenuta in varie località italiane: nei monti presso Palermo (Sicilia), nelle Alpi Apuane (Toscana), sulle pendici della Majella (Abruzzo), in stazioni prossime al mare delle Marche meridionali, in Romagna, nei pressi di Milano (Lombardia), in Val d'Aosta, a Trieste, in Dalmazia e altrove nell'area mediterranea.

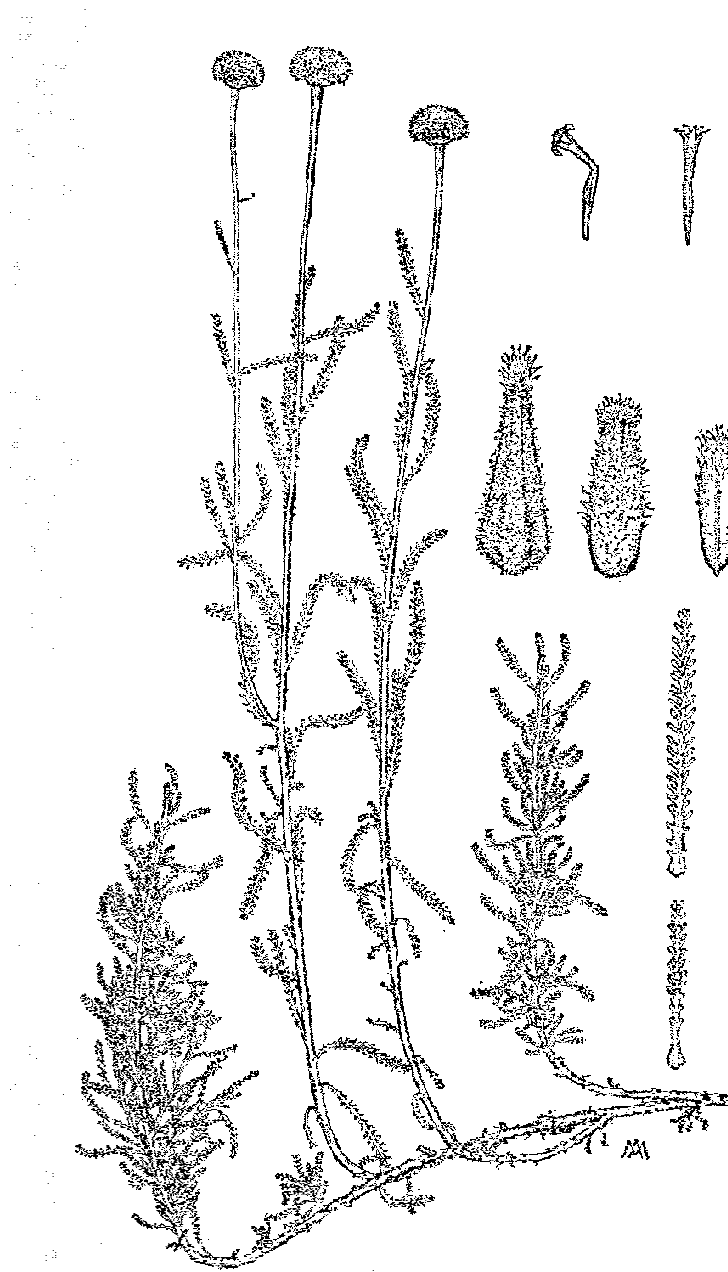


Fig. 23. *Santolina marchii* (da Arrigoni, 1977).



Fig. 24. *Santolina marchii*, specie pentaploide coltivata: (a) individui in coltivazione (dintorni di Viterbo, Lazio settentrionale); (b) gli stessi con foglie in primo piano (Foto: C. Olmati).

***S. benthamiana* Jord. et Fourr., 1869 = *S. chamaecyparissus* subsp. *tomentosa* (Pers.) Arcangeli, 1882**

Pianta cespugliosa alta (fino 50 cm), eretta o ascendente; getti sterili da verdi a grigi-tomentosi; getti fertili generalmente semplici, senza foglie per una certa distanza al di sotto del capolino (Fig. 25). Involucro largo 6-10 mm, emisferico, subtruncato e da leggermente a non umbilicato alla base. Brattee da lanceolate ad ovate, crenate, quelle interne con apice arrotondato, lacero-scarioso. Foglie densamente da pettinate-dentate a pennatisette, spesso glabre; lobi lunghi 2,5-7 mm. Involucro generalmente glabro; fiori biancastri o giallo pallido, portati da peduncoli non ingrossati in alto (Guinea e Tutin, 1993).

Specie della regione mediterranea occidentale e centrale, cresce su substrati calcarei tra i 300 e i 1'900 m, in garighe (Guinea e Tutin, 1993. Fig. 26).

Specie diploide con $2n = 18$ (Guinea e Tutin, 1993).

***Santolina viscosa* Lagasca 1816**

Pianta glabra o sparsamente puberulenta, ghiandolare-viscida, raggiunge i 15-40 cm di altezza (Fig. 27). Getti sterili brevi, densamente foliosi; getti fertili ramificati in modo panicolato, foliosi quasi fino al capolino, scarsamente ingrossato all'apice. Foglie addensate alla base, quasi tutte pettinato-pinnatosette, con lobi in due file. Foglie apicali piccole, intere. Involucro largo 10-15 mm, subgloboso; brattee esterne non crenate, ovato-lanceolate, acute o acuminate; quelle interne oblunghe con apici larghi, lacero-scariosi.

S. viscosa è endemica della penisola iberica, con areale ristretto alla Spagna meridionale nell'area di Murcia e Almería (Fig. 28); cresce in garighe su suoli gessosi, tra il livello del mare e i 600 m di altitudine (Guinea, 1970; Guinea e Tutin, 1993; Blanca, 2009).

E' specie diploide con $2n = 18$ (Blanca, 2009).



Fig. 25. *S. benthamiana* (= *S. chamaecyparissus tomentosa*) (Foto: Blanca *et al.*, 2009).

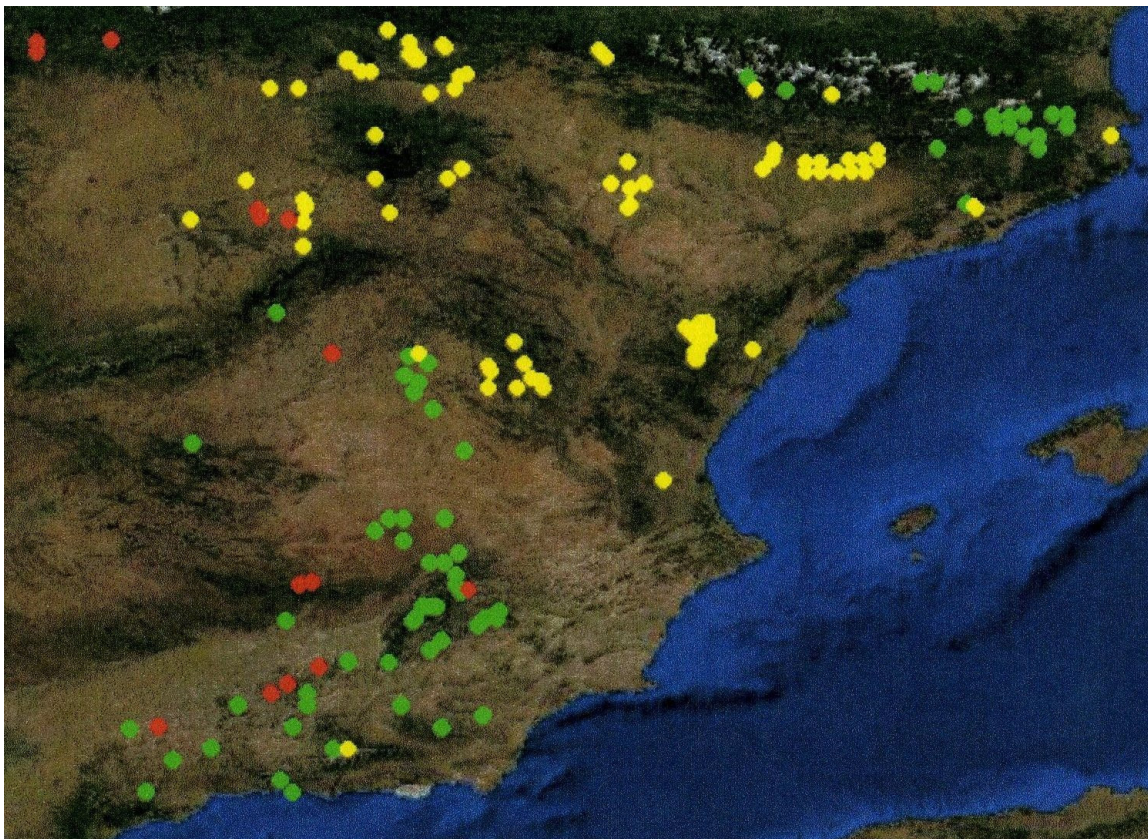


Fig. 26. Alcuni taxa iberici del genere *Santolina*: *S. benthamiana* (= *S. chamaecyparissus tomentosa*), cerchi in verde; *S. villosa* (= *S. chamaecyparissus squarrosa*), cerchi in giallo; *S. marchii* (= *S. chamaecyparissus chamaecyparissus*), cerchi in rosso (da www.anthos.es).



Fig. 27. *S. viscosa* (Foto: Blanca *et al.*, 2009).



Fig. 28. Areale di *Santolina viscosa*, endemismo della Spagna sud-orientale (cerchi in rosso) (da www.anthos.es).

2.3. Test di germinazione e riproduzione *in vitro*: risultati

I semi di tutte le specie saggiate hanno germinato entro 30 giorni dalla semina in ogni esperimento

I risultati dei test di germinazione effettuati sono riportati nelle Tab. 13-15, mentre nelle Fig. 29 e 30 sono riportate le microfotografie, scattate allo stereomicroscopio, delle fasi di germinazione *in vitro*. Nelle figure 31-35 sono mostrati gli istogrammi relativi alle percentuali di germinazione e delle fasi successive di sviluppo e le curve di germinazione.

In generale, tutte le specie di *Santolina* hanno dato come risultato buone percentuali di germinazione e tempi di germinazione brevi, come illustrato dai valori di T_{50} (Tab. 13 e 14) e dalle curve di germinazione (Fig. 32 e 34).

In un primo esperimento, dove sono stati messi a confronto campioni di semi di *S. etrusca* raccolti da due diverse stazioni presenti nel Lazio (Tab. 13), si sono ottenuti i risultati descritti di seguito. Le percentuali di germinazione osservate sono comprese tra il 24,4% e il 40% per i campioni provenienti dalla popolazione di Acquapendente (SEA); sono comprese tra il 68,9% e il 76,7% per i campioni SEB* (Bassano in Teverina, raccolta 2006); sono comprese tra il 71,1% e il 76,7% per i campioni SEB** (Bassano in Teverina, raccolta 2009).

L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative nel tasso di germinazione tra i campioni di controllo e campioni di semi imbibiti in acqua distillata in nessuna delle due popolazioni esaminate. L'analisi statistica ha però evidenziato differenze significative tra un campione proveniente nella stazione di Acquapendente (SEA) e quelli raccolti nella stazione di Bassano in Teverina (SEB* e SEB**). Nello specifico, da un confronto tra i dati ottenuti dai campioni provenienti dalle due stazioni sono emerse delle differenze significative tra il campione SEA 48h e SEB* 0h ($0.01 < P < 0.05$; Tukey test); tra SEA 48h e SEB* 24h ($0.01 < P < 0.05$); tra SEA 48h e SEB* 48h ($P < 0.01$); tra SEA 48h e SEB** 0h ($P < 0.01$); tra SEA 48h e SEB** 24h ($0.01 < P < 0.05$); tra SEA 48h e SEB** 48h ($0.01 < P < 0.05$) (come mostrato in Tab. 16).

Per quanto riguarda il numero di individui che hanno raggiunto gli stadi successivi di sviluppo (cotiledoni e prima coppia fogliare), tutti i campioni esaminati hanno dato come risultato delle percentuali elevate comprese tra il 92,1% e il 100%. Lo stesso risultato è stato osservato per le plantule sopravvissute al trasferimento su terriccio (100%)

Tab. 13. Percentuali di germinazione e degli stadi di sviluppo successivi per *Santolina etrusca*. I semi sono stati immersi in acqua distillata per 0 (controllo), 24 e 48 ore a temperatura ambiente (25°C) e in seguito incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; T₅₀: numero di giorni necessari per la germinazione del 50% dei semi; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute 30 giorni dopo la semina. SEB*: semi raccolti nel 2006; SEB**: semi raccolti nel 2009. S.D.: deviazione standard.

Sigla	Località	Data di raccolta	Condizioni di stoccaggio dei semi	Pre-trattamento	G (media±S.D.)	T ₅₀ giorni	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (media±S.D.)
SEA 0h	Torrente Fossatello, R.N. Monterufeno, Acquapendente, Viterbo, Lazio (Italia)	12.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	---	40.0 ± 5.8	2.8	97.4 ± 4.4	92.1 ± 7.7	100.0
SEA 24h		12.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	40.0 ± 23.1	2.4	100.0	98.3 ± 2.9	100.0
SEA 48h		12.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h a 25°C	24.4 ± 12.6	2.6	100.0	96.7 ± 5.8	100.0
SEB* 0h	Bassano Scalo, Bassano in Teverina, Viterbo, Lazio (Italia)	04.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	---	72.2 ± 5.1	2.6	98.5 ± 2.6	95.6 ± 7.5	100.0
SEB* 24h		04.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	68.9 ± 13.1	3.2	95.8 ± 7.2	98.5 ± 2.6	100.0
SEB* 48h		04.10.2006	buste carta/15-20% umidità relativa e 15°C	imbibizione in H ₂ Odist per 48 h a 25°C	76.7 ± 5.8	2.9	95.6 ± 4.2	95.3 ± 4.6	100.0

(continua)

Tab. 13. (Continua/2).

Sigla	Località	Data di raccolta	Condizioni di stoccaggio dei semi	Pretrattamento	G (media±S.D.)	T ₅₀ giorni	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (media±S.D.)
SEB** 0h	Bassano Scalo, Bassano in Teverina, Viterbo, Lazio (Italia)	09.10.2010	buste carta/25°C	---	76.7 ± 20.3	4.0	100.0	90.9 ± 8.0	100.0
SEB** 24h		09.10.2010	buste carta/25°C	imbibizione in H ₂ Odist per 24 h a 25°C	74.4 ± 15.0	3.9	96.6 ± 3.0	97.2 ± 2.5	100.0
SEB** 48h		09.10.2010	buste carta/25°C	imbibizione in H ₂ Odist per 48h a 25°C	71.1 ± 16.8	4.1	94.6 ± 5.8	90.3 ± 4.1	100.0

Tab. 14. Percentuali di germinazione e delle fasi di sviluppo successive per *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA, SEB), *S. neapolitana* (SNF), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG). I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; T₅₀: numero di giorni necessari per la germinazione del 50% dei semi; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di piante sopravvissute dopo 50 giorni dalla semina. S.D.: deviazione standard.

Taxon	Sigla	Località	G (media±S.D.)	T ₅₀ (giorni)	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (media±S.D.)
<i>S. ligustica</i>	SLL	tra Levanto e Bonassola, La Spezia, Liguria (Italia)	37.8 ± 26.7	1.7	100.0	100.0	100.0
<i>S. etrusca</i>	SEA	Torrente Fossatello, R.N. Montefurlo, Acquapendente, Viterbo Lazio (Italia)	40.0 ± 5.8	2.8	97.4 ± 4.4	92.09 ± 7.7	100.0
	SEB	Bassano Scalo, Bassano in Teverina, Viterbo, Lazio (Italia)	74.5 ± 12.6	3.3	99.2 ± 1.3	93.3 ± 7.0	100.0
<i>S. neapolitana</i>	SNF	Monte Faito, Castellammare di Stabia, Napoli, Campania (Italia)	75.6 ± 15.0	3.3	97.3±2.4	94.4 ± 5.0	100.0
<i>S. benthamiana</i>	SBG	Sierra de Lújar, Granada (Spagna)	57.8 ± 11.7	2.5	98.4 ± 2.8	36.2 ± 16.5	100.0
<i>S. viscosa</i>	SVG	Sorbas, Los Yesares, Almería (Spagna)	92.2 ± 13.5	0.6	97.4 ± 2.3	88.0 ± 10.3	100.0

Tab. 15. Percentuali di germinazione e delle fasi di sviluppo successive per *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG). I semi sono stati sottoposti ad un processo di sterilizzazione e successivamente incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 30 giorni dalla semina. cs: percentuale di semi contaminati. S.D.: deviazione standard.

Taxon	Sigla	Località	G (media±S.D.)	cs (media±S.D.)	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (media±S.D.)
<i>S. ligustica</i>	SLL	Levanto, La Spezia, Liguria (Italia)	41.7 ± 14.4	20.8±15	83.9 ±18.1	100.0	100.0
<i>S. etrusca</i>	SEA	Torrente Fossatello, R.N. Monte- rufeno, Acquapendente, Viterbo Lazio (Italia)	38.5 ± 23.9	4.2	100.0	100.0	100.0
<i>S. benthamiana</i>	SBG	Sierra de Lújar, Granada (Spagna)	58.3 ± 12.5	15.3±10.5	100.0	100.0	100.0
<i>S. viscosa</i>	SVG	Sorbas, Los Yesares, Almería (Spagna)	76.4 ± 2.5	11.1±2.4	98.2 ± 3.2	100.0	100.0

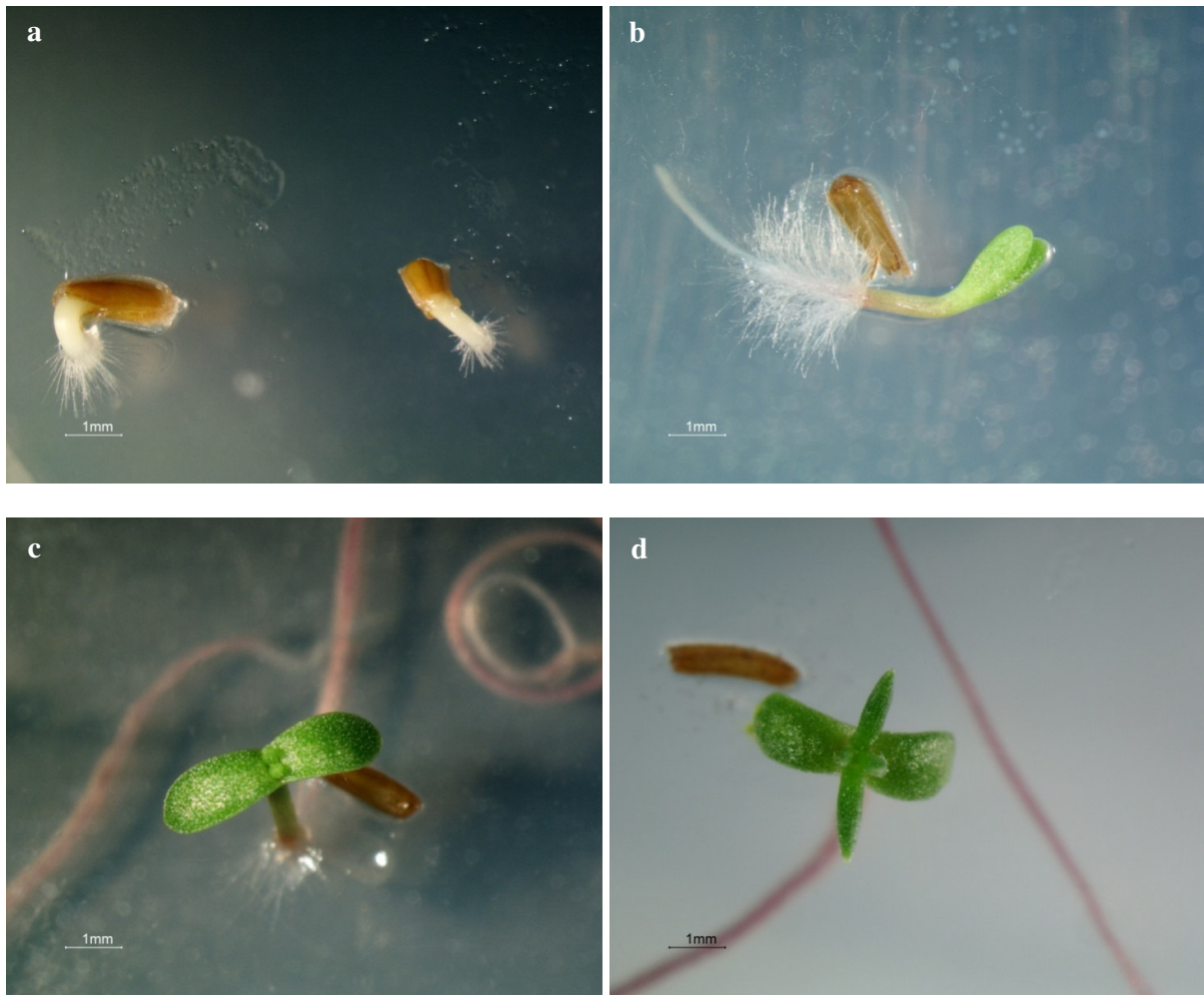


Fig. 29. Stadi della germinazione *in vitro* di *Santolina etrusca* (a) germinazione ($\times 0.8$); (b) cotiledoni ($\times 0.8$); (c) prima coppia fogliare ($\times 0.8$) (d) plantula ($\times 0.8$). (Foto: C. Olmati).

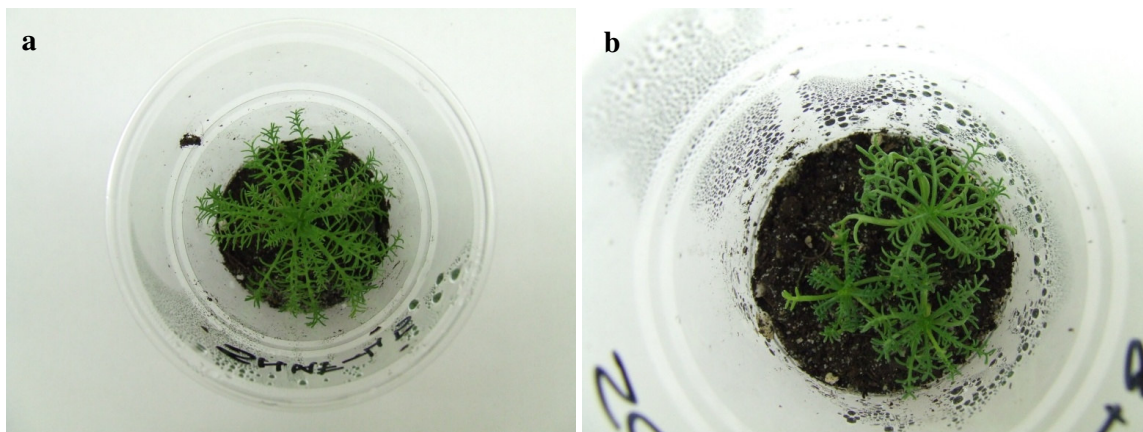


Fig. 30. Giovani piante di *Santolina* dopo quattro settimane di coltura *in vitro* (a) *S. neapolitana* (b) *S. benthamiana* (Foto: C. Olmati).

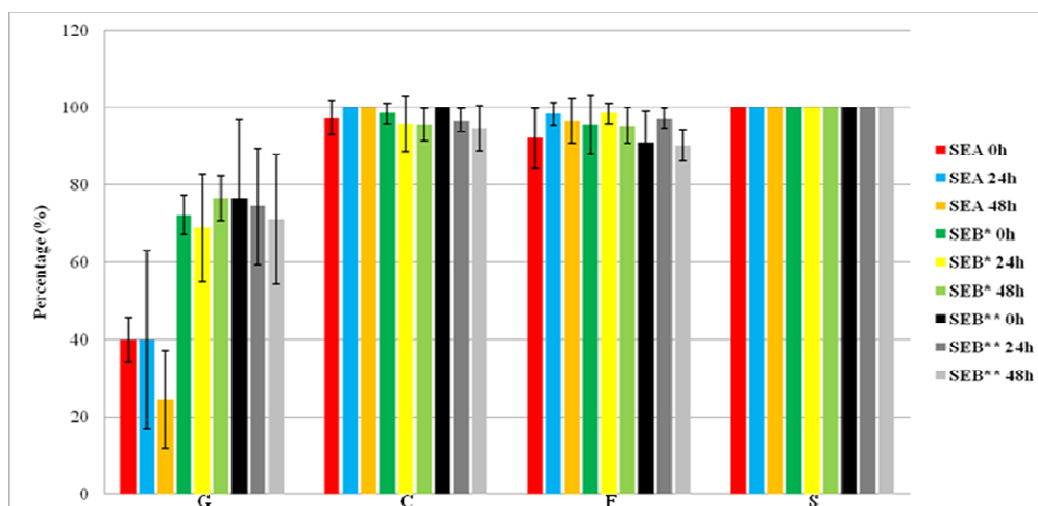


Fig. 31. Percentuali di germinazione e delle fasi di sviluppo successive per *Santolina etrusca*. SEA: semi raccolti dalla popolazione di Acquapendente nell'ottobre del 2006; SEB*: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina nell'ottobre del 2006; SEB**: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina nell'ottobre del 2009. I semi sono stati immersi in acqua distillata per 0 (controllo) 24 e 48 ore a temperatura ambiente (25°C) e successivamente sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 30 giorni dalla semina. Le linee verticali mostrano la deviazione standard.

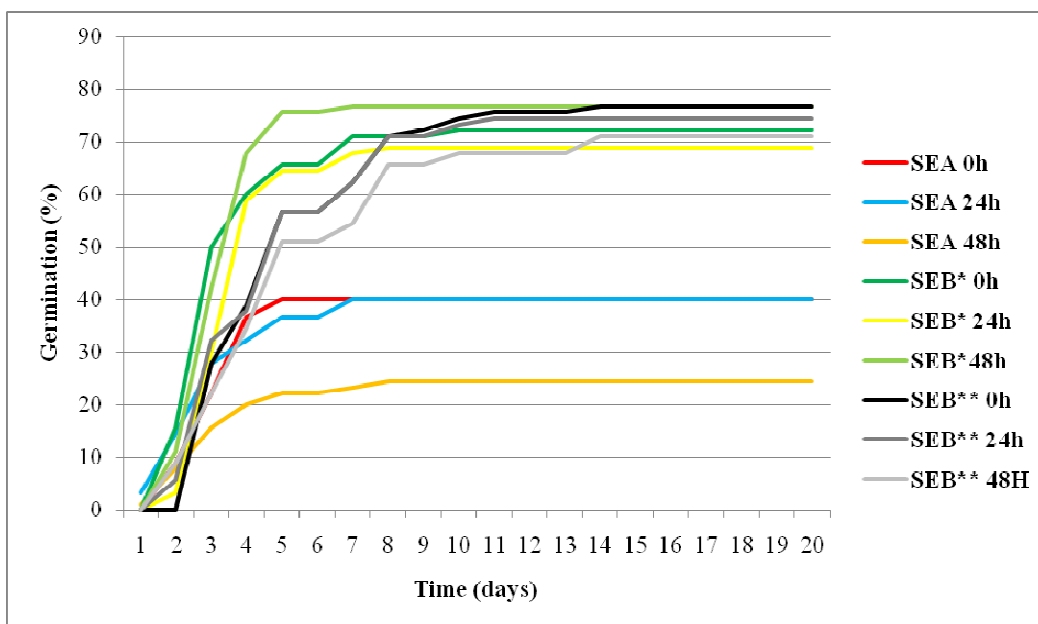


Fig. 32. Andamento nel tempo della germinazione dei semi di *Santolina etrusca*. SEA: semi raccolti dalla popolazione di Acquapendente nell'ottobre del 2006; SEB*: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina nell'ottobre del 2006; SEB**: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina nell'ottobre del 2009. I semi sono stati immersi in acqua distillata per 0 (controllo) 24 e 48 ore a temperatura ambiente (25°C) e successivamente sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h ; 20±1°C).

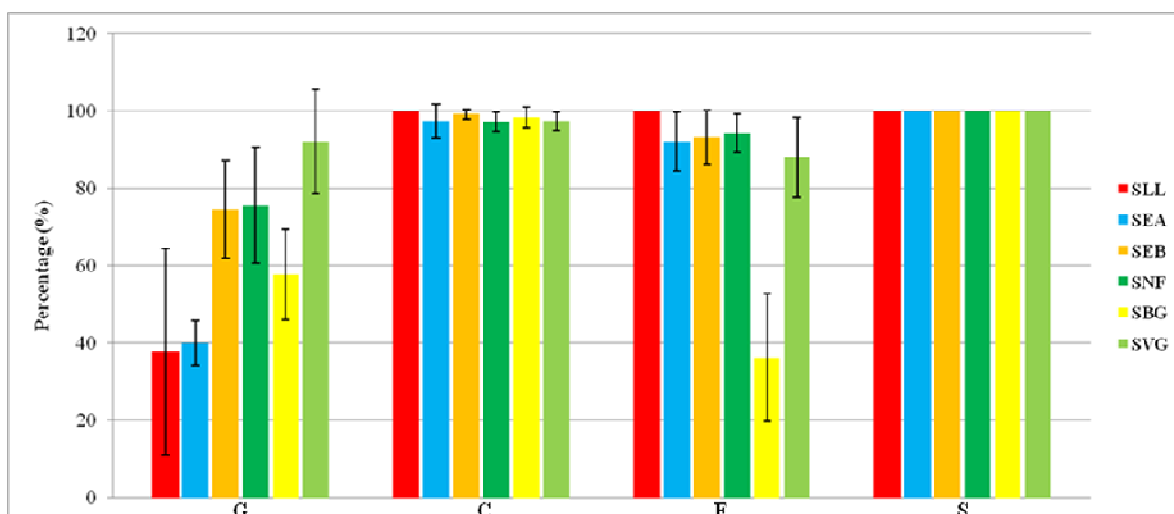


Fig. 33. Percentuali di germinazione e delle fasi di sviluppo successive per *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA, SEB), *S. neapolitana* (SNF), *S. benthamiana* (SBG), *S. viscosa* (SVG). I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 30 giorni dalla semina. Le linee verticali mostrano la deviazione standard.

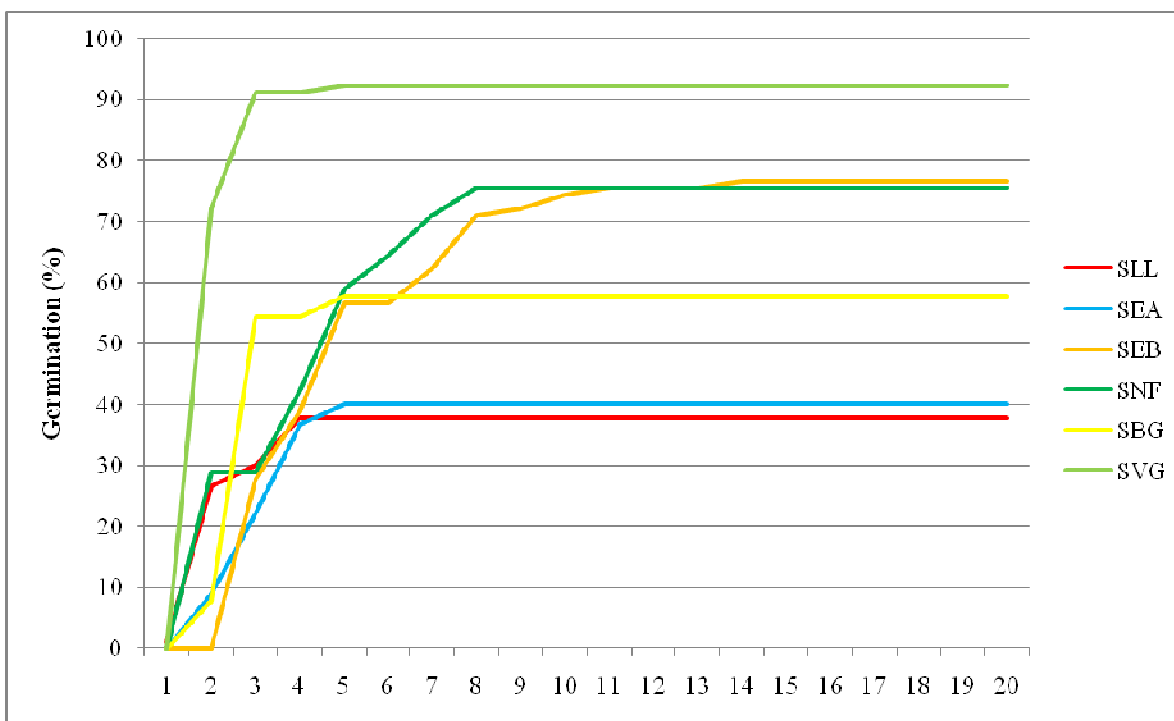


Fig. 34. Andamento nel tempo della germinazione dei semi di *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA, SEB), *S. neapolitana* (SNF), *S. benthamiana* (SBG), *S. viscosa* (SVG). I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$).

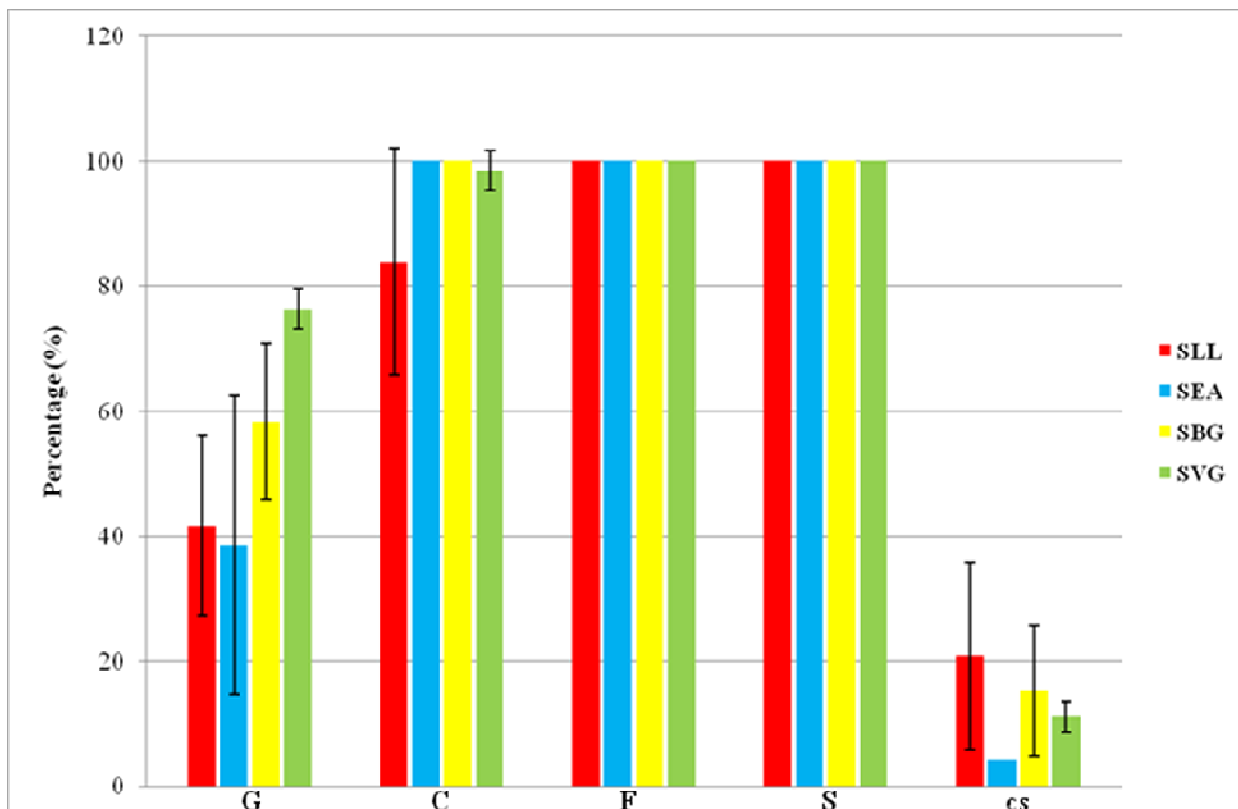


Fig. 35. Percentuali di germinazione e delle fasi di sviluppo successive per *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG). I semi sono stati sterilizzati e successivamente incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20 \pm 1^\circ\text{C}$). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 30 giorni dalla semina; percentuale di semi contaminati. Le linee verticali mostrano la deviazione standard.

Tab. 16. Matrice che mostra i livelli di significatività (Tukey test) per le differenze nei confronti a coppia delle percentuali di germinazione (G) in *Santolina etrusca*. I dati rappresentano le differenze tra le medie delle percentuali di germinazione. SEA: semi raccolti dalla popolazione di Acquapendente, ottobre 2006; SEB*: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina, ottobre 2006; SEB**: semi raccolti dalla popolazione di Bassano in Teverina, ottobre 2009. I semi sono stati immersi in acqua distillata per 0 (controllo) 24 e 48 ore a temperatura ambiente (25°) e successivamente incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). ** $P < 0.01$; * $0.01 < P < 0.05$; n.s.: non significativo.

G	SEA 0h	SEA 24h	SEA 48h	SEB* 0h	SEB* 24h	SEB* 48h	SEB** 0h	SEB** 24h
SEA 0h	---							
SEA 24h	n.s.	---						
SEA 48h	n.s.	n.s.	---					
SEB* 0h	n.s.	n.s.	*	---				
SEB* 24h	n.s.	n.s.	*	n.s.	---			
SEB* 48h	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	---		
SEB** 0h	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	---	
SEB** 24h	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	---
SEB** 48h	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In una seconda prova, dove sono stati utilizzati i semi di *S. ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA e SEB), *S. neapolitana* (SNF), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG) si sono ottenuti i dati descritti di seguito. La percentuale di germinazione più alta è stata osservata nel campione di semi SVG (92,2%) mentre le percentuali di germinazione più basse sono state osservate nei due campioni di semi SLL e SEA (37,8% e 40,0%). Dal confronto delle percentuali di germinazione sono emerse delle differenze tra alcuni campioni esaminati; l'analisi statistica ha mostrato infatti una differenza significativa tra le percentuali di germinazione dei campioni SLL e SVG ($0,01 < P < 0,05$; Tukey test) e dei campioni SEA e SVG ($0,01 < P < 0,05$) (Tab. 17).

La percentuale di individui che hanno raggiunto la fase di cotiledoni è stata elevata per tutti i campioni di semi (97,3 - 100%).

Inoltre, la percentuale di individui che hanno raggiunto la fase di prima coppia fogliare è compresa tra il 36,2% e il 100%. Per questo parametro una differenza significativa ($P < 0.01$; Tukey test) è emersa tra il campione SBG e tutti gli altri campioni (SLL, SEA, SEB, SNF, SVG).

Infine, il tasso di sopravvivenza di giovani piante al trasferimento su terriccio è stata del 100% per tutti campioni di semi analizzati.

Tab. 17. Matrice che mostra i livelli di significatività (Tukey test) per le differenze nei confronti a coppia delle percentuali di germinazione (G, sotto la diagonale) e delle percentuali di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia di foglie (F, sopra la diagonale) in *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA, SEB), *S. neapolitana* (SNF), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG). **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$; n.s.: non significativo.

G \ F	SLL	SEA	SEB	SNF	SBG	SVG
SLL	---	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.
SEA	n.s.	---	n.s.	n.s.	**	n.s.
SEB	n.s.	n.s.	---	n.s.	**	n.s.
SNF	n.s.	n.s.	n.s.	---	**	**
SBG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	---	n.s.
SVG	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	---

Riproduzione *in vitro*

Sono stati utilizzati semi di *S. ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG).

Le percentuali di germinazione più alte sono state osservate nei campioni di semi SBG e SVG (58,3% e 76,4%) mentre le più basse sono state osservate nei campioni SEA e SLL (38,5% e 41,7%)

L'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa tra la percentuale di germinazione del campione SVG e i campioni SLL e SEA ($0,01 < P < 0,05$; test t di Student, Tab. 18).

Le percentuali di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni sono state alte per tutti i campioni di semi sottoposti al trattamento di sterilizzazione (83,9 - 100%). Lo stesso risultato è stato osservato per il numero di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare (100%). Anche il tasso di sopravvivenza delle plantule trasferite da multiwell in contenitori di plastica trasparente è stata alta (100%).

Infine, il numero di colture sterili ottenute con questa procedura è buono. La percentuale di contaminazione (batteri, lieviti e funghi) più bassa è stata osservata nel campione di semi SEA (4,2%) mentre quella più alta nel campione SLL (20,8%).

L'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa nella percentuale di contaminazione solo tra i campioni SEA e SVG ($P < 0.01$; test t di Student).

Al momento vi è un solo studio pubblicato sulla la riproduzione *in vitro* di specie appartenenti al genere *Santolina*. In questo studio Iglesias *et al.* (2000) ottengono piante di *S. melidensis*. a partire da semi con risultati ottimali (97 - 98%) utilizzando il mezzo semisolido MS (Murashige e Skoog, 1962) e incubando le colture a 25/15°C con fotoperiodo 16/8h o nel buio totale.

I dati ottenuti da queste prove di germinazione e riproduzione *in vitro* mostrano che la propagazione da seme è un metodo praticabile per la conservazione *ex situ* delle specie del genere *Santolina*.

Tab. 18. Matrice che mostra i livelli di significatività (Student's t-test) per le differenze nei confronti a coppia delle percentuali di germinazione (G, sotto la diagonale) e delle percentuali di semi contaminati (cs, sopra la diagonale) in *Santolina ligustica* (SLL), *S. etrusca* (SEA), *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG). **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$; n.s.: non significativo.

G \ cs	SLL	SEA	SBG	SVG
SLL	---	n.s.	n.s.	n.s.
SEA	n.s.	---	n.s.	**
SBG	n.s.	n.s.	---	n.s.
SVG	*	*	n.s.	---

2.4. Ricerche genetiche su taxa del genere *Santolina*: materiali, metodi, risultati

Le popolazioni di *Santolina* studiate geneticamente appartengono alle seguenti specie:

- taxa diploidi italiani ($2n = 18$):

S. pinnata (= *S. leucantha*): Pian della Fioba, nei pressi dell'Orto Botanico "Pietro Pellegrini" (Alpi Apuane): sigla SPO (Fig. 36);

S. ligustica: tra Levanto e Bonassola (Liguria orientale): sigla SLL (Fig. 37);

S. etrusca: Radicofani (Toscana): sigla SER (Fig. 38);

Acquapendente (Lazio): sigla SEA (Fig. 38);

Bassano in Teverina (Lazio): sigla SEB (Fig. 38);

S. neapolitana: Monte Faito, penisola sorrentina (Campania): sigla SNF (Fig. 39);

- taxa diploidi iberici ($2n = 18$):

S. benthamiana (= *S. chamaecyparissus* subsp. *tomentosa*): Sierra de Lújar (dintorni di Granada, Andalusia, Spagna): sigla SBG (Fig. 40);

S. viscosa: Sorbas, Los Yesares, Almería (dintorni di Granada, Andalusia Spagna): sigla SVG (Fig. 40).

- taxa poliploidi:

S. marchii ($5x = 45$): nursery dei dintorni di Viterbo (Lazio): sigla MVT;
nursery nei dintorni di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées, Francia sud-occidentale): sigla SMP;

S. insularis ($6x = 54$): nursery nei dintorni di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées, Francia sud-occidentale, materiale originato da talee di individui sul campo della Sardegna centro-meridionale): sigla IMP.

Sono stati studiati i seguenti sedici loci (tra parentesi l'enzima codificato e il numero di codice): *Mdh* (Malato deidrogenasi NAD^+ dipendente, E.C. 1.1.1.37); *Mdhp* (Malato deidrogenasi NADP^+ dipendente, E.C. 1.1.1.40); *Idh-1*, *Idh-2* (Isocitrato deidrogenasi, E.C. 1.1.1.42); *6Pgdh-1*, *6Pgdh-2* (6-Fosfogluconato deidrogenasi, E.C. 1.1.1.44); *Ugpp-1*, *Ugpp-2* (Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfa-



Fig. 36. Località di raccolta del campione analizzato di *S. pinnata* (SPO).



Fig. 37. Località di raccolta del campione analizzato di *S. ligustica* (SLL).



Fig. 38. Località di raccolta dei campioni analizzati di *S. etrusca* (SER, SEA, SEB).

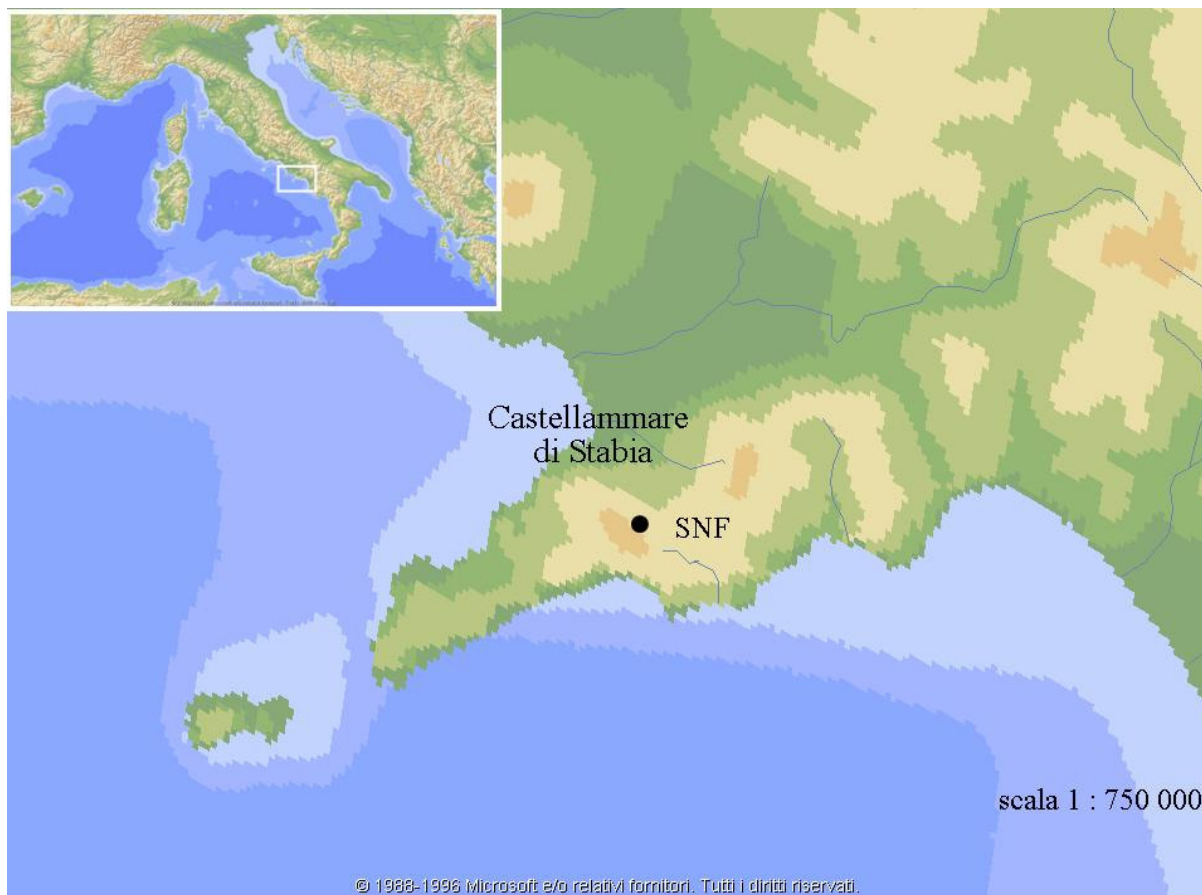


Fig. 39. Località di raccolta del campione analizzato di *S. neapolitana* (SNF).



Fig. 40. Località di raccolta dei campioni di *S. benthamiana* (SBG) e *S. viscosa* (SVG) studiati. Il tratto continuo delimita l'areale di *S. viscosa*, quello tratteggiato l'areale iberico di *S. benthamiana*.

tasi, E.C. 2.7.7.9); *Aco-1*, *Aco-2* (Aconitasi, E.C. 4.2.1.3); *Tpi-1*, *Tpi-2* (Trioso fosfato isomerasi, E.C. 5.3.1.1); *Gpi-1*, *Gpi-2* (Glucosio fosfato isomerasi, E.C. 5.3.1.9); *Pgm-1*, *Pgm-2* (Fosfoglucomutasi, E.C. 5.4.2.2).

Gli alleli sono stati indicati nel modo seguente: l'indice 100 è stato attribuito all'allele più comune nel campione di *S. etrusca* proveniente da Bassano in Teverina; indici maggiori (o minori) sono stati dati agli altri alleli, a seconda della loro mobilità elettroforetica crescente (o, rispettivamente) decrescente rispetto all'allele 100.

Le frequenze alleliche, calcolate sulla base dei fenotipi elettroforetici osservati ai 16 loci considerati nei campioni dei taxa diploidi di *Santolina* studiati, sono riportate in Tab. 19.

Le caratteristiche dei 16 geni enzimatici nei taxa di *Santolina* considerati sono date nella Tab. 20.

In Tab. 21 sono riportati i parametri di variabilità genetica e di eterozigosi per le popolazioni e i taxa diploidi studiati.

Il campione con la più alta variabilità tra quelli delle santoline diploidi studiate appartiene alla specie *S. benthamiana* ed è stato raccolto nella Sierra de Lújar (dintorni di Granada, Andalusia, Spagna). Questa specie ha un areale assai ampio e la popolazione da cui il campione è stato tratto è assai numerosa. Tale campione presenta un numero medio di alleli per locus di 1,9, una percentuale di loci polimorfici (criterio del 95%) dell'81%, un'eterozigosi media attesa del 28%. Più bassa è la variabilità genetica osservata nel campione di *S. neapolitana* del Monte Faito, nella penisola sorrentina (Campania). In tale campione $A = 1,7$, $P_{95} = 50\%$, $He = 16\%$. Questo campione è stato prelevato da una delle due sole popolazioni sopravvissute in questo taxon endemico ad areale disgiunto e fortemente relitto (Fig. 3 e 39). Di poco terzo per livello di variabilità genetica è il campione di *S. pinnata* del Pian della Fioba (Alpi Apuane, Toscana): $A = 1,6$, $P_{95} = 50\%$, $He = 16\%$; questo endemismo è presente nelle Alpi Apuane con numerose popolazioni di dimensioni medio-piccole. Non dissimili sono i parametri della variabilità genetica nel campione di *S. ligustica* raccolto tra Levanto e Bonassola (Liguria occidentale): $A = 1,6$, $P_{95} = 44\%$, $He = 15\%$ e in quello dell'affine *S. etrusca* raccolto nei dintorni di Acquapen-

Tab. 19. Frequenze alleliche, calcolate sulla base dei fenotipi elettroforetici osservati ai 16 loci analizzati, nei campioni dei taxa diploidi di *Santolina* studiati. Per le sigle vedi Tab. 1. N = numero di individui saggiati.

Locus	<i>S. etrusca</i>			<i>S. ligustica</i>	<i>S. pinnata</i>	<i>S. benthamiana</i>		<i>S. viscosa</i>
	SER	SEA	SEB	SLL	SPO	<i>S. neapolitana</i> SNF	SBG	SVG
<i>Mdh</i>								
92	0.05	0.10	0.06	0.20	--	0.69	0.15	0.17
100	0.95	0.90	0.93	0.71	0.25	0.31	0.84	0.82
106	---	---	---	0.09	0.75	---	---	---
(N)	20	29	31	38	18	31	29	20
<i>Mdhp</i>								
86	---	---	---	---	---	---	---	0.57
91	---	---	---	---	---	---	---	0.43
94	---	---	---	---	0.33	0.06	---	---
100	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.94	0.99	---
(N)	20	27	30	37	27	42	35	27
<i>Idh-1</i>								
92	---	---	---	---	---	0.03	---	---
100	1.00	1.00	1.00	1.00	0.64	0.93	0.46	1.00
103	---	---	---	---	---	0.04	---	---
110	---	---	---	---	0.36	---	0.54	---
(N)	20	25	32	30	36	43	35	19
<i>Idh-2</i>								
93	---	---	---	---	---	---	0.21	---
100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.79	1.00
(N)	20	20	34	40	29	45	26	23
<i>6Pgdh-1</i>								
100	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00	0.49	1.00	0.15
104	---	---	---	0.04	---	0.51	---	0.85
(N)	18	29	31	41	38	40	40	24
<i>6Pgdh-2</i>								
90	---	---	---	---	0.07	---	---	---
95	---	---	---	---	---	---	0.14	0.12
100	0.81	0.78	0.97	1.00	0.93	1.00	0.86	0.71
105	0.19	0.22	0.03	---	---	---	---	0.17
(N)	18	27	29	41	36	40	39	24

(continua)

Tab. 19. (Continua/2).

Locus	<i>S. etrusca</i>			<i>S. ligustica</i>	<i>S. pinnata</i>	<i>S. benthamiana</i>		
	SER	SEA	SEB			<i>S. neapolitana</i>	<i>S. viscosa</i>	
	SLL	SPO	SNF	SBG	SVG			
<i>Ugpp-1</i>								
89	---	---	---	---	---	---	0.25	---
91	---	0.15	0.14	0.37	---	0.64	---	---
95	0.07	0.40	0.27	0.58	0.83	0.30	0.02	1.00
100	0.93	0.45	0.59	0.05	0.17	0.06	0.73	---
(N)	20	20	11	31	15	28	24	15
<i>Ugpp-2</i>								
90	---	---	---	--	0.03	--	---	---
92	--	0.03	0.23	0.78	---	1.00	0.39	---
95	0.53	0.38	0.41	---	0.87	---	0.61	1.00
100	0.47	0.59	0.36	0.22	0.10	---	---	---
(N)	20	29	17	46	31	31	37	27
<i>Aco-1</i>								
96	0.11		0.12	0.08	---	0.14	---	---
98	---	---	---	---	---	---	0.12	---
100	0.89	0.88	0.92	1.00	0.86	0.93	0.88	1.00
102	---	---	---	---	---	0.07	---	---
(N)	18	4	6	12	14	7	16	8
<i>Aco-2</i>								
97	---	---	---	---	---	---	0.29	---
100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.70	1.00
(N)	21	24	7	15	15	10	21	12
<i>Tpi-1</i>								
100	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00	1.00	0.88	1.00
105	---	---	---	0.14	---	---	0.12	---
(N)	20	14	1	7	3	4	12	3
<i>Tpi-2</i>								
100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00
104	---	---	---	---	---	---	0.14	---
(N)	8	17	1	6	5	6	11	6
<i>Gpi-1</i>								
100	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
103	---	---	0.03	---	---	---	---	---
(N)	19	18	33	30	15	29	24	16

(continua)

Tab. 19. (Continua/3).

	<i>S. etrusca</i>			<i>S. ligustica</i>	<i>S. pinnata</i>	<i>S. neapolitana</i>	<i>S. benthamiana</i>	<i>S. viscosa</i>
Locus	SER	SEA	SEB	SLL	SPO	SNF	SBG	SVG
<i>Gpi-2</i>								
94	0.12	0.18	0.07	0.34	---	0.06	0.04	0.19
97	---	---	---	---	---	---	0.67	---
100	0.88	0.82	0.93	0.66	1.00	0.94	0.29	0.81
(N)	20	17	36	37	14	35	24	16
<i>Pgm-1</i>								
93	0.16	0.14	---	---	---	---	---	---
96	---	---	---	---	0.80	---	0.61	1.00
100	0.84	0.75	0.81	0.94	0.20	1.00	0.39	---
103	--	0.11	0.19	0.06	---	---	---	---
(N)	16	28	16	36	23	27	31	12
<i>Pgm-2</i>								
95	---	---	---	0.13	---	0.52	---	---
97	---	---	---	---	---	---	---	0.35
100	1.00	1.00	1.00	0.87	0.97	0.40	0.95	0.65
103	---	---	---	---	---	0.07	0.05	---
105	---	---	---	---	0.03	---	---	---
(N)	8	24	17	46	33	41	28	28

Tab. 20. Caratteristiche dei 16 geni enzimatici nelle specie di *Santolina* studiate.

Geni enzimatici	alleli elettroforetici	osservazioni
<i>Mdh</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	92	manca in <i>S. pinnata</i> e <i>S. marchii</i>
	106	presente in <i>S. pinnata</i> e <i>S. ligustica</i> locus polimorfico, differenziato, ma relativamente omogeneo
<i>Mdhp</i>	100	presente in tutte le specie diploide, eccetto <i>S. viscosa</i> , e in quelle poliploidi
	94	presente in <i>S. pinnata</i> , <i>S. neapolitana</i> , e in <i>S. insularis</i>
	86	presente in <i>S. viscosa</i>
	91	presente in <i>S. viscosa</i> locus polimorfico, differenziato, relativamente omogeneo tranne che in <i>S. viscosa</i>, in cui è diagnostico
<i>Idh-1</i>	100	presente in tutte le specie eccetto <i>S. insularis</i>
	110	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. pinnata</i> , <i>S. insularis</i>
	92	presente in <i>S. insularis</i> e al 3% in <i>S. neapolitana</i>
	103	al 4% in <i>S. neapolitana</i> locus polimorfico, differenziato soprattutto in <i>S. insularis</i>, ma anche in <i>S. benthamiana</i> e <i>S. pinnata</i>
<i>Idh-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	93	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. insularis</i> locus poco polimorfico, differenziato in <i>S. benthamiana</i> e <i>S. insularis</i>
<i>6Pgdh-1</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	104	presente in <i>S. neapolitana</i> , <i>S. viscosa</i> locus poco polimorfico, differenziato in <i>S. neapolitana</i> e <i>S. viscosa</i>
<i>6Pgdh-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	105	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. marchii</i> , <i>S. viscosa</i>
	95	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. viscosa</i>
	90	presente in <i>S. pinnata</i> locus polimorfico, differenziato; differenzia da una parte <i>S. benthamiana</i> e <i>S. viscosa</i>, dall'altra <i>S. etrusca</i>, <i>S. marchii</i>, <i>S. viscosa</i>
<i>Ugpp-1</i>	100	presente in tutte le specie tranne che in <i>S. viscosa</i> e in <i>S. insularis</i>
	95	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	91	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. ligustica</i> , <i>S. neapolitana</i> , <i>S. marchii</i>
	89	presente in <i>S. benthamiana</i>
	102	presente in <i>S. insularis</i> ; finora non osservato in altre specie locus polimorfico, differenziato; differenzia in particolare <i>S. marchii</i> e <i>S. insularis</i>

(continua)

Tab. 20. (Continua/2).

Geni enzimatici	alleli elettroforetici	osservazioni
<i>Ugpp-2</i>	100	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. ligustica</i> , <i>S. pinnata</i> , <i>S. marchii</i> , <i>S. insularis</i>
	95	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. pinnata</i> , <i>S. benthamiana</i> , <i>S. viscosa</i> , <i>S. marchii</i> , <i>S. insularis</i>
	92	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. ligustica</i> , <i>S. neapolitana</i> , <i>S. benthamiana</i> , <i>S. marchii</i> , <i>S. insularis</i>
	90	presente in <i>S. pinnata</i> locus polimorfico, differenziato, fissato con tre alleli in <i>S. marchii</i> e <i>S. insularis</i>
<i>Aco-1</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	96	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. pinnata</i> , <i>S. insularis</i>
	98	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. marchii</i>
	102	presente in <i>S. neapolitana</i> locus polimorfico, poco differenziato
<i>Aco-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	97	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. neapolitana</i> locus polimorfico, poco differenziato
<i>Tpi-1</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	105	presente in <i>S. ligustica</i> , <i>S. benthamiana</i> locus poco polimorfico, poco differenziato
<i>Tpi-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	104	presente in <i>S. benthamiana</i> , <i>S. etrusca</i> locus poco polimorfico, poco differenziato
<i>Gpi-1</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi locus monomorfo
<i>Gpi-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	94	presente in tutte le specie diploidi e in <i>S. insularis</i> , ma non in <i>S. marchii</i>
	97	presente in <i>S. benthamiana</i> locus poco polimorfico, poco differenziato
<i>Pgm-1</i>	100	presente in tutte le specie diploidi, tranne <i>S. viscosa</i> , e nella specie poliploidi
	96	presente in <i>S. pinnata</i> , <i>S. benthamiana</i> , <i>S. viscosa</i> (monomorfa), <i>S. marchii</i> , ma non in <i>S. insularis</i>
	93	presente in <i>S. etrusca</i>
	103	presente in <i>S. etrusca</i> , <i>S. ligustica</i>
	98	osservato solo nel poliploide <i>S. insularis</i> locus polimorfico, differenziato

Tab. 20. (Continua/3).

Geni enzimatici	alleli elettroforetici	osservazioni
<i>Pgm-2</i>	100	presente in tutte le specie diploidi e poliploidi
	95	presente in <i>S. ligustica</i> , <i>S. neapolitana</i> , <i>S. insularis</i>
	97	presente in <i>S. viscosa</i> , <i>S. marchii</i>
	103	presente in <i>S. pinnata</i> , <i>S. neapolitana</i> , <i>S. benthamiana</i>
	105	presente in <i>S. pinnata</i>
		locus polimorfico, differenziato

Tab. 21. Parametri di variabilità genetica (A : numero medio di alleli per locus; P_{99} , P_{95} : proporzione di loci polimorfici con il criterio dello 0.99 e dello 0.95, rispettivamente) e di eterozigosi (H_o : eterozigosi media osservata per locus; H_e : eterozigosi media attesa per locus) nei campioni delle popolazioni dei taxa diploidi studiati (tra parentesi l'errore standard).

Popolazione	A	P_{99}	P_{95}	H_o	H_e
<i>S. pinnata</i>					
SPO	1.6 (0.2)	0.56	0.50	0.129 (0.042)	0.162 (0.045)
<i>S. ligustica</i>					
SLL	1.6 (0.2)	0.50	0.44	0.142 (0.044)	0.153 (0.049)
<i>S. etrusca</i>					
SER	1.4 (0.1)	0.44	0.44	0.102 (0.038)	0.111 (0.039)
SEA	1.6 (0.2)	0.44	0.44	0.156 (0.054)	0.166 (0.054)
SEB	1.6 (0.2)	0.50	0.37	0.131 (0.055)	0.132 (0.053)
<i>S. etrusca</i> <i>valori medi</i>	1.5	0.46	0.42	0.130	0.136
<i>S. neapolitana</i>					
SNF	1.7 (0.2)	0.50	0.50	0.141 (0.049)	0.156 (0.053)
<i>S. benthamiana</i>					
SBG	1.9 (0.1)	0.81	0.81	0.264 (0.045)	0.277 (0.045)
<i>S. viscosa</i>					
SVG	1.4 (0.2)	0.37	0.37	0.141 (0.051)	0.143 (0.050)

te (Lazio settentrionale): $A = 1,6$, $P_{95} = 44\%$, $He = 17\%$. In media, tuttavia, i parametri della variabilità in questo taxon dell'Italia centrale tirrenica sono risultati più bassi: $A = 1,5$, $P_{95} = 42\%$, $He = 14\%$, come, del resto, maggiore è la relittazione delle sue popolazioni rispetto a quelle del taxon della Liguria orientale *S. ligustica*. L'areale di quest'ultima entità ha, tuttavia, un'estensione assai minore di quello di *S. etrusca*. Ma è il campione dell'endemismo iberico *S. viscosa*, specie ad areale relitto della Spagna meridionale, quello che ha mostrato la variabilità genetica più bassa tra le santoline diploidi considerate: $A = 1,4$, $P_{95} = 37\%$, $He = 14\%$. I dati ottenuti mostrano che i principali parametri della variabilità genetica sono correlati, in questo gruppo di Asteraceae, come in molti altri gruppi sia vegetali che animali, con l'ampiezza dell'areale della specie, col numero di popolazioni che attualmente sopravvivono e con la loro dimensione. Nei taxa con areali relitti, poche popolazioni e di piccole dimensioni la variabilità è più bassa e inferiori sono, di conseguenza, le probabilità che le popolazioni sopravvivano nel tempo.

La Tab. 22 mostra, infine, una matrice delle distanze e delle identità genetiche medie secondo Nei (1972), ricavata dai valori delle frequenze alleliche osservate ai 16 loci analizzati elettroforeticamente nei sei taxa diploidi del genere *Santolina* studiati.

Questi dati mostrano che la distanza genetica media del taxon endemico della Liguria orientale *S. ligustica* è risultata la medesima ($D_{Nei} = 0,066$) sia rispetto a *S. etrusca* che a *S. neapolitana*, nonostante la separazione geografica assai minore tra *S. ligustica* e *S. etrusca* che tra *S. ligustica* e *S. neapolitana*. Inoltre tale valore di distanza è molto basso; tra specie strettamente affini (e non di rado anche tra sottospecie di una medesima specie) la distanza genetica è in media superiore ($D_{Nei} = 0,1$), come da tempo è stato dimostrato sia negli animali (Bullini e Sbordonì, 1980) che nelle piante (Bullini *et al.*, 1989). Basse sono risultate anche le distanze genetiche medie tra *S. ligustica* e le popolazioni di *S. etrusca* studiate: D_{Nei} da 0,05 a 0,09; poco maggiori sono quelle tra quest'ultimo taxon e *S. neapolitana*: D_{Nei} da 0,14 a 0,19. Tali dati indicano come il differenziamento tra *S. ligustica*, *S. etrusca* e *S. neapolitana* sia recente e sia, almeno in parte, legato all'entità e alla durata dell'isolamento

Tab. 22. Matrice delle distanze genetiche medie (D , sotto la diagonale) e delle identità genetiche medie (I , sopra la diagonale) calcolati con la formula di Nei (1972) sulla base dei 16 loci studiati tra i campioni delle popolazioni diploidi di *Santolina* considerati.

Population	SER	SEA	SEB	SLL	SPO	SNF	SBG	SVG
<i>S. etrusca</i>								
SER	---	0.985	0.987	0.910	0.851	0.825	0.892	0.743
SEA	0.015	---	0.991	0.946	0.874	0.854	0.877	0.772
SEB	0.013	0.010	---	0.954	0.874	0.874	0.895	0.765
<i>S. ligustica</i>								
SLL	0.094	0.055	0.048	---	0.840	0.936	0.848	0.739
<i>S. pinnata</i>								
SPO	0.161	0.134	0.135	0.174	---	0.765	0.846	0.842
<i>S. neapolitana</i>								
SNF	0.193	0.158	0.135	0.066	0.269	---	0.766	0.718
<i>S. benthamiana</i>								
SBG	0.114	0.131	0.111	0.165	0.167	0.267	---	0.724
<i>S. viscosa</i>								
SVG	0.297	0.258	0.267	0.303	0.172	0.332	0.323	---

geografico; questo è, a sua volta, influenzato dal grado di relittazione degli areali, fenomeno attualmente in corso in tutti e tre questi taxa.

Ad esempio gli areali dei taxa *ligustica* ed *etrusca*, attualmente nettamente disgiunti, erano probabilmente in contatto solo pochi secoli fa. Le popolazioni del taxon *ligustica*, che rappresentano il contingente più settentrionale, erano presenti fino a pochi decenni fa a Riomaggiore e nelle Cinque Terre. D'altra parte, popolazioni del taxon *etrusca* venivano osservate fino alla metà dell'ottocento lungo il fiume Serchio. Nel 1860, ad esempio, era conosciuta una popolazione di *etrusca* a Vecchiano, nei dintorni di Lucca. La Versilia e le aree che circondano il Golfo di La Spezia, potenzialmente adattissime allo sviluppo di *etrusca* e *ligustica*, hanno verosimilmente visto la scomparsa delle popolazioni di tali piante quando la costruzione di infrastrutture (la via Aurelia in epoca romana, la tratta ferroviaria costiera Genova-Firenze, più rapida e diretta dei collegamenti su rotaia preesistenti, nell'ottocento-primi novecento, l'autostrada da Livorno al confine italo-francese negli ultimi decenni del novecento), l'urbanizzazione e le conurbazioni delle aree costiere liguri e della Toscana settentrionale (la cosiddetta "rapallizzazione"), il turismo balneare e residenziale, lo sviluppo dell'area portuale di La Spezia e di altri porti minori tra Genova e Livorno, la costruzione, a partire dalla metà dell'ottocento, dell'Arsenale militare di La Spezia, il suo successivo ampliamento e la rete stradale e ferroviaria sviluppatasi parallelamente e in stretta connessione col porto e con lo stesso Arsenale, ecc. ne hanno determinato prima la rarefazione e poi l'estinzione. Lo stesso fenomeno è del resto in atto in molte altre aree italiane, francesi e spagnole dove sono presenti (o erano presenti fino a pochi decenni fa) popolamenti di *Santolina*.

I dati ottenuti fanno ritenere che in Italia peninsulare fosse presente un antenato comune di tutti gli attuali taxa diploidi di *Santolina*. L'areale di tale antenato si estendeva dall'Italia centrale tirrenica (ove attualmente è presente *S. etrusca*) a nord in Liguria (abitata oggi da *S. ligustica*) e a sud in Campania (ove attualmente vive *S. neapolitana*). Da tale antenato si differenziarono in isolamento geografico da una parte l'endemismo delle Alpi Apuane *S. pinnata*, la cui distanza genetica media dagli

altri taxa (*S. ligustica*, *S. etrusca* e *S. neapolitana*, la cui affinità genetica abbiamo dimostrato) è $D_{Nei} = 0,19$, dall'altra la specie tirrenica che si estendeva dalla Liguria alla Campania e che include le popolazioni dei tre taxa citati. A tale specie va attribuito per priorità il nome *S. neapolitana* Jord. et Fourr., 1869, *sensu lato*. Va notato che *S. etrusca* fu descritta da Lacaita nel 1925 come varietà di *S. chamaecyparissus* (ma sarebbe stato meglio considerarla varietà di *S. neapolitana*). Lacaita, infatti, non credeva che *S. chamaecyparissus* esistesse in Italia. Solo nel 1973 *S. etrusca* fu elevata al rango specifico da Marchi e D'Amato, mentre *S. ligustica* fu elevata al rango di specie da Arrigoni nel 1977.

Attualmente, data la già ricordata relittazione in atto dei tre taxa *ligustica*, *etrusca* e *neapolitana* (nonché della maggior parte delle loro popolazioni), il problema del loro status tassonomico può essere affrontato e risolto sperimentalmente solo creando aree di simpatria artificiale, ove studiare la loro ibridazione e introgressione.

Tali ricerche, iniziate e condotte per vari anni da McAllister nell'Orto Botanico di Liverpool (McAllister, 1987, e *in litteris*) e in seguito proseguite in Italia e in Spagna, hanno mostrato che individui dei tre taxa *ligustica*, *etrusca* e *neapolitana* ibridano liberamente e danno semi fertili. Va ricordato che McAllister (1987) considera un'unica specie, *S. neapolitana*, in cui include i tre taxa sopra ricordati.

Allo stato attuale delle conoscenze, tenendo conto in particolare del basso differenziamento genetico tra i tre taxa *ligustica*, *etrusca* e *neapolitana* e della loro interfertilità in aree di simpatria artificiale, essi vanno considerati come sottospecie di *S. neapolitana*.

Una distanza genetica media simile a quella osservata tra *S. neapolitana s.l.* e *S. pinnata* si osserva sia tra quest'ultima specie e *S. benthamiana* ($D_{Nei} = 0,17$), sia tra *S. neapolitana s.l.* e *S. benthamiana* ($D_{Nei} = 0,18$). Infine l'endemismo della Spagna meridionale *S. viscosa* presenta valori di distanza genetica media crescenti con, rispettivamente, *S. pinnata* ($D_{Nei} = 0,17$), *S. neapolitana s.l.* ($D_{Nei} = 0,30$) e *S. benthamiana* ($D_{Nei} = 0,32$).

In Fig. 41 viene data una rappresentazione grafica delle relazioni filetiche tra i taxa diploidi di *Santolina* studiati sulla base dei valori di distanza genetica di Nei (1972).

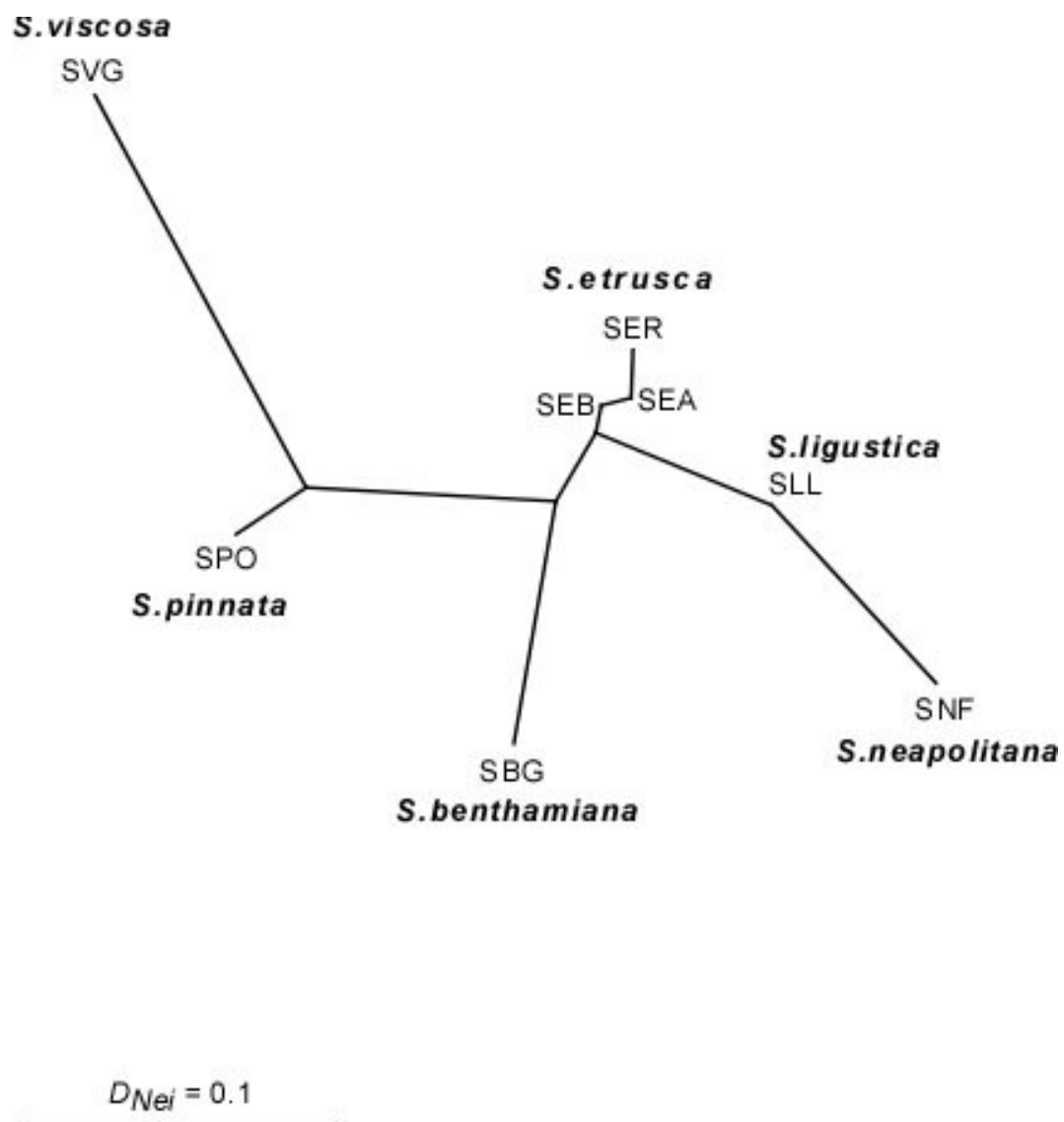


Fig. 41. Rappresentazione grafica (Unrooted Neighbour Joining Tree), costruita sulla base dei valori di distanza genetica di Nei (1972), delle relazioni filetiche tra i taxa diploidi di *Santolina* studiati (per le sigle vedi Tab. 1).

S. marchii

S. marchii presenta sia nel campione italiano dei dintorni di Viterbo che in quello francese di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées) il medesimo fenotipo elettroforetico ai 16 loci considerati:

<i>Mdh</i>	<i>Mdhp</i>	<i>Idh-1</i>	<i>Idh-2</i>	<i>6Pgdh-1</i>	<i>6Pgdh-2</i>	<i>Ugpp-1</i>	<i>Ugpp-2</i>
100	100	100	100	100	100/105	91/95/100	92/95/100

<i>Aco-1</i>	<i>Aco-2</i>	<i>Tpi-1</i>	<i>Tpi-2</i>	<i>Gpi-1</i>	<i>Gpi-2</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>
98/100	100	100	100	100	100	96/100	97/100

Tutti i loci hanno l'allele 100, spesso il più comune nelle popolazioni di *Santolina* saggiate, o in omozigosi o, ai loci *6Pgdh-2*, *Ugpp-1*, *Ugpp-2*, *Aco-1*, *Pgm-1* e *Pgm-2* in eterozigosi fissata con gli alleli: *6Pgdh-2*¹⁰⁵, *Ugpp-1*⁹¹ e *Ugpp-1*⁹⁵, *Ugpp-2*⁹² e *Ugpp-2*⁹⁵, *Aco-1*⁹⁸, *Pgm-1*⁹⁶ e *Pgm-2*⁹⁷. Di questi otto alleli, sei sono stati osservati in *S. benthamiana* (= *S. chamaecyparissus tomentosa*), cinque in *S. etrusca*, quattro in *S. viscosa* e tre in *S. pinnata*, *S. ligustica* e *S. neapolitana*.

Da un punto di vista genetico *S. marchii* potrebbe derivare dall'incrocio: *S. etrusca* x *S. benthamiana*. Infatti *S. etrusca* può dare, insieme agli alleli 100, gli alleli *6Pgdh-2*¹⁰⁵, *Ugpp-1*⁹¹, *Ugpp-1*⁹⁵, *Ugpp-2*⁹² e *Ugpp-2*⁹⁵, mentre *S. benthamiana* può dare, oltre agli alleli 100, gli altri tre alleli di *S. marchii*: *Aco-1*⁹⁸, *Pgm-1*⁹⁶ e *Pgm-2*⁹⁷.

Questa ipotesi richiederebbe: un'ibridazione *S. etrusca* x *S. benthamiana*, con la formazione di un ibrido di F₁ diploide, che va incontro a tetraploidizzazione (per esempio grazie a gameti non ridotti). Tale tetraploide dovrebbe produrre un gamete non ridotto 4x che, reincrociando con un gamete aploide di tipo parentale, darebbe origine al pentaploide *S. marchii*. Quest'ultimo avrebbe, tuttavia, solo 5 cromosomi subtelocentrici (st), e non i 7 (8) osservati in *S. marchii*. Nei diploidi di *Santolina* dell'Italia peninsulare, infatti, vi è solo una coppia di cromosomi st (Marchi e D'Amato, 1973).

Questi autori formulano una diversa ipotesi sull'origine di *S. marchii*. Quest'ultima si sarebbe originata dall'incrocio di una specie esaploide di tipo *S. insularis* ($6x = 54$, 12 st) x una specie tetraploide di tipo *S. rosmarinifolia* ($4x = 36$, 4 st). Tale ipotesi non si accorda, tuttavia, con i dati allozimici (per la struttura genetica di *S. insularis* vedi il paragrafo seguente).

Anche le santoline diploidi italiane hanno 2 st, come *S. rosmarinifolia* diploide; i loro tetraploidi potrebbero, quindi, essere considerati per un'origine di *S. marchii* con l'ipotesi di Marchi e D'Amato (1973). In tal caso *S. marchii* deriverebbe dall'incrocio tra un ibrido *S. etrusca* x *S. benthamiana* tetraploidizzato x un esaploide *S. insularis*. Come vedremo nel prossimo paragrafo, tuttavia, *S. insularis* ha alleli che non si trovano in *S. marchii*, per cui anche questa ipotesi deve essere scartata.

L'importanza filogenetica attribuita da Marchi e D'Amato (1973) al numero di cromosomi subtelocentrici (st) non appare, quindi, confermata. Il clone italiano di *S. marchii* che ha sette cromosomi st, e quello francese, che ne ha otto, sono risultati, come detto sopra, uguali dal punto di vista allozimico.

S. insularis

S. insularis, endemismo esaploide ($6x = 54$) della Sardegna centro-meridionale, è stato da noi studiato geneticamente su un campione proveniente da una nursery francese nei dintorni di Villeneuve-sur-Lot (Midi-Pyrénées) e costituito da piante derivate per talea da individui di campo sardi.

L'analisi genetica è stata condotta sui medesimi 16 loci analizzati in *S. marchii*. I quattro esemplari saggiati hanno mostrato il fenotipo seguente:

<i>Mdh</i>	<i>Mdhp</i>	<i>Idh-1</i>	<i>Idh-2</i>	<i>6Pgdh-1</i>	<i>6Pgdh-2</i>	<i>Ugpp-1</i>	<i>Ugpp-2</i>
92/100	94/100	92/110	93/100	100	100	95/102	92/95/100

<i>Aco-1</i>	<i>Aco-2</i>	<i>Tpi-1</i>	<i>Tpi-2</i>	<i>Gpi-1</i>	<i>Gpi-2</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>
96/100	100	100	100	100	94/100	98/100	95/100

A differenza di quanto osservato in *S. marchii*, a due loci: *Idh-1* e *Ugpp-1*, non è stato osservato l'allele 100. Inoltre, tra i 13 alleli diversi da 100 (*Mdh-2*⁹², *Mdhp*⁹⁴, *Idh-1*⁹² e *Idh-1*¹¹⁰, *Idh-2*⁹³, *Ugpp-1*⁹⁵ e *Ugpp-1*¹⁰², *Ugpp-2*⁹² e *Ugpp-2*⁹⁵, *Aco-1*⁹⁶, *Gpi-2*⁹⁴, *Pgm-1*⁹⁸, *Pgm-2*⁹⁵) due (*Ugpp-1*¹⁰² e *Pgm-1*⁹⁸) non sono stati osservati in nessuna delle specie di *Santolina* da noi studiate; è anche possibile che si siano originati per mutazione.

In *S. insularis* i loci fissati in eterozigosi sono nove, tre di più rispetto a *S. marchii*. Dei 13 alleli diversi da 100 osservati in *S. insularis*, otto sono stati osservati in *S. pinnata* e *S. neapolitana*, sei in *S. etrusca* e *S. benthamiana*, cinque in *S. ligustica* e quattro in *S. viscosa*. Rispetto a *S. marchii* risulta quindi più difficile ipotizzare un incrocio che dal punto di vista allozimico possa aver dato origine a *S. insularis*.

CAPITOLO 3

RICERCHE SULLA GERMINAZIONE IN VITRO E SULLA DIVERSITÀ GENETICA DI *HOTTONIA PALUSTRIS*

3.1. Introduzione

Hottonia L. 1753, è un piccolo genere delle Primulaceae che comprende due erbe acquatiche: la specie americana *H. inflata* Elliot, 1817 e l'europea *H. palustris* L., 1753. La prima specie, *H. inflata* (Fig. 42), cresce in acque tranquille, poco profonde o, occasionalmente, su suolo bagnato. Viene trovata negli Stati Uniti orientali, dalla Florida al Texas e a nord fino agli stati del Maine, New Hampshire, New York, Ohio, Indiana, Illinois, Missouri e Oklahoma (Fernald, 1950; Steyermark, 1963; Gleason e Cronquist, 1991). E' assente, tuttavia, dall'area della Prairie Peninsula dell'Illinois, Indiana e Ohio (Stuckey, 1983). Nelle diverse aree occupate da questa specie essa viene considerata criticamente minacciata, rara, a rischio o di particolare interesse (Baskin *et al.*, 1996). Una pianta matura di *H. inflata* ha un fusto sommerso che porta foglie pinnato-settate; alla superficie dell'acqua il fusto produce un gruppo di peduncoli cavi e pieni d'aria. I fiori sono disposti in spirali di 2-10 all'attaccatura sui peduncoli (Fernald, 1950; Steyermark, 1963; Strausbaugh e Core, 1978). E' una pianta annuale che germina e cresce in autunno e inverno, raggiungendo la superficie dell'acqua e fiorendo in primavera (Fernald, 1950).

La specie europea, *Hottonia palustris*, è una pianta erbacea perenne, subglabra, con stoloni striscianti e fusti eretti con foglie (30-90 cm). Le foglie di 2-13 cm sono alternate o verticillate, sommerse e galleggianti, mono bipinnate, con lobi lineari. Le infiorescenze di (15-)30-40(60) cm sono bratteate, con 3-9 spirali di fiori; peduncoli di 12-30 mm, ghiandolari-pubescenti, deflessi nel frutto. Il calice misura 4-6 mm, uguale alla parte tubuliforme della corolla, è lobato quasi alla base; i lobi sono lineari. La corolla ha un diametro di 20-25 mm ed è violetta con la gola gialla. Il frutto è una capsula (3-6 mm) e i semi sono marroni, poligonali, di dimensioni 700-800 µm, con la superficie formata da placche irregolari. I granuli pollinici sono larghi 10-11 µm,

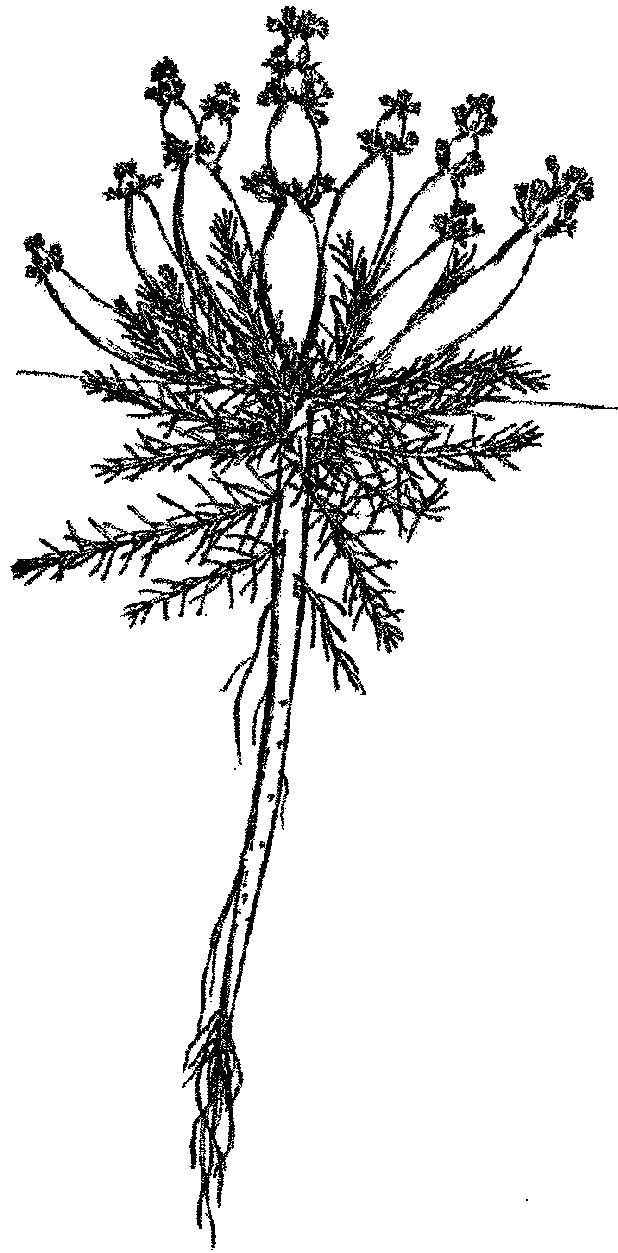


Fig. 42. *Hottonia inflata* (da Fassett, 1957).

arrotondati, 3-colporati con sculturazioni reticolate (Ferguson, 1980; Tornadore *et al.*, 2000).

H. palustris si sviluppa tipicamente in acque profonde 30 cm o più; possiede un lungo rizoma strisciante che termina alla superficie dell'acqua con una infiorescenza su una asse verticale con numerosi fiori disposti a spirale (Fig. 43). La parte più vecchia del rizoma si trova generalmente seppellita nel fango ed è spesso ramificata, formando stoloni che frequentemente danno origine a branche verticali, aeree, le cosiddette “forme terrestri”. Ciò costituisce un metodo di propagazione in quanto, quando muoiono le parti più vecchie del fusto, le giovani piante si separano e, nel caso il livello dell'acqua si alzi, danno origine a nuovi individui sviluppati. Le forme terrestri non vengono mai trovate a più di 50-60 cm di distanza dall'acqua. *Hottonia* produce numerosissime radici avventizie, specialmente nella parte sotterranea e alla base dell'infiorescenza. I fiori sono molto simili per struttura a *Primula*, con la lieve differenza che nelle forme brevistile lo stigma si trova alla bocca del tubo-corolla, mentre nelle longistile sporge dalla parte tubuliforme della corolla.

Hottonia palustris ha un sistema eteromorfo di incompatibilità, con due morfe fiorali che differiscono per la posizione relativa dello stigma e delle antere nel fiore. Gli individui longistili (*pin*) sono più frequenti di quelli brevistili (*thrum*; Ford, 1971; Weeda *et al.*, 1988). La produzione massima di semi si ha quando il polline viene trasferito tra morfe diverse (Ford, 1971; Brys *et al.*, 2007).

Il fiore di *H. palustris* viene visitato da un numero elevato di specie impollinatrici, come Syrphidae e Empididae; Brys e collaboratori (2007) suggeriscono, tuttavia, in base ad osservazioni in Belgio, che la maggior parte degli impollinatori appartenga alla famiglia degli Apidae (perlopiù api e bombi).

H. palustris mostra anche una marcata riproduzione clonale (Brock *et al.*, 1989): gli individui possono, infatti, produrre getti indipendenti e, nel tempo, ciò consente la formazione di popolazioni stabili spazialmente strutturate (Weeda *et al.*, 1988). Tale sistema riproduttivo misto consente alle popolazioni con una sola morfa fiorale di persistere nel tempo. Inoltre, l'autoincompatibilità tra le due morfe fiorali è piuttosto debole ed è possibile sia la cleistogamia, attraverso l'autoimpollinazione di

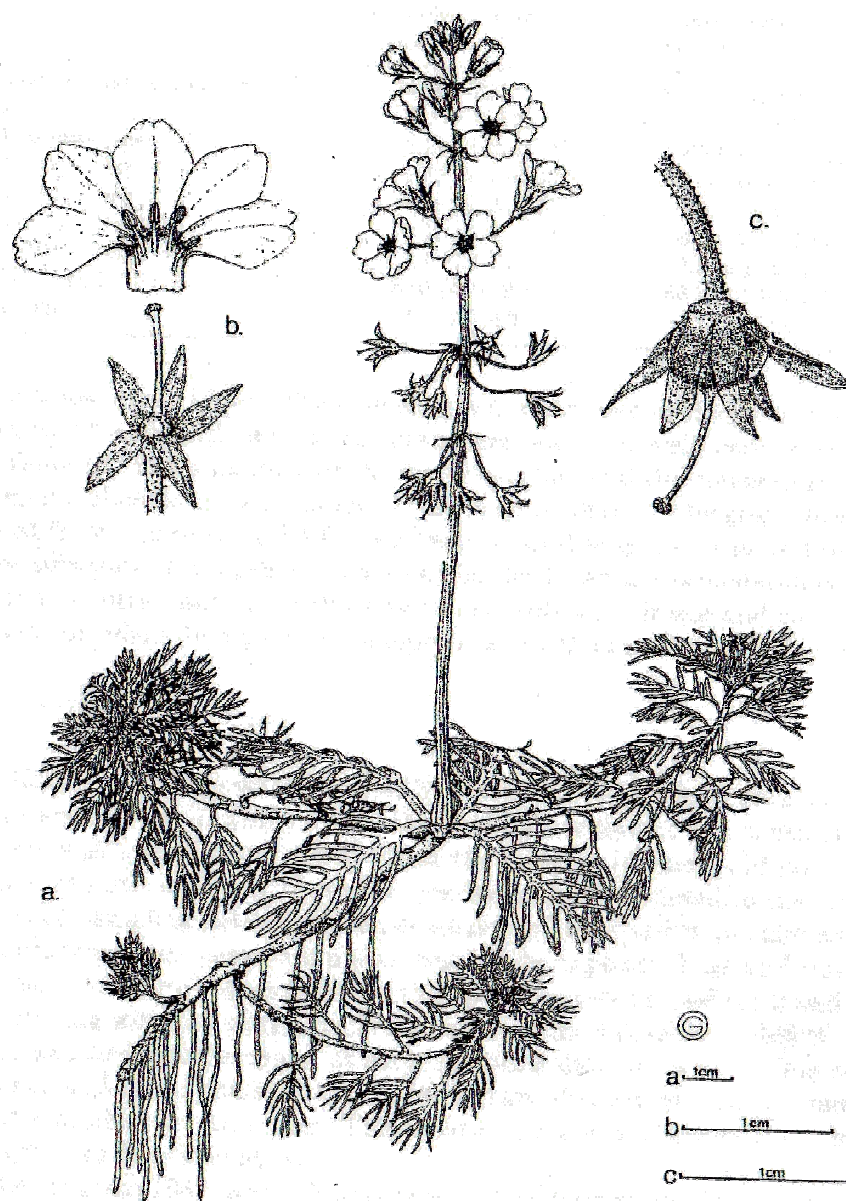


Fig. 43. *Hottonia palustris* : (a) habitus; (b) sezione del fiore; (c) frutto maturo (da Brock *et al.*, 1989).

fiori sommersi ancora chiusi (Weeda *et al.*, 1988) che incroci intramorfe, mediante geitogamia, per impollinazione di fiori dello stesso ramet ed incroci tra individui della stessa morfa (Darwin, 1877). Tali modalità, tuttavia, portano ad uno scarso sviluppo sia del frutto che dei semi (Brys *et al.*, 2007). Le piccole dimensioni delle popolazioni e la prevalenza di una morfa fiorale hanno, quindi, un'influenza negativa sul successo riproduttivo (Brys *et al.*, 2007), verosimilmente per l'inbreeding elevato.

Il numero cromosomico di *H. palustris* è $2n = 20$ (Ferguson, 1993; Moore, 1982; Amadei *et al.*, 1982; Dvorák, 1989). La formula cromosomica è: $2n = 20: 14m + 2sm + 4m$; vi sono 9 coppie di cromosomi metacentrici e una di submetacentrici in 8° posizione. I cromosomi sono piccoli (circa 1-2µm) (Tornadore *et al.*, 2000).

H. palustris è specie eurosiberiana che vive nelle pianure delle zone fredde e temperato-fredde dell'Eurasia, dalla Scandinavia meridionale alla Siberia e all'Asia Minore (Hegi, 1927; Ferguson, 1993; Haslam, 1978; Haulten e Fries, 1986; Babij *et al.*, 1999). E' stata segnalata per i seguenti paesi: Austria, Belgio, Bosnia Herzegovina, Gran Bretagna, Croazia, Cecoslovacchia, Danimarca, Francia, Germania, Ungheria; in Irlanda la specie non è autoctona e secondo Minchin (2007) rappresenta un caso di espansione dell'areale, anche se si propaga solo per via vegetativa. La si trova inoltre in Italia, Montenegro, Paesi Bassi, Polonia, Romania, Federazione Russia, Slovenia, Svezia e Svizzera. Dopo il 1945, è stata trovata in Slovenia tra le regioni prealpina e subpannonica (Wraber, 1969; Zupančič *et al.*, 1987; Wraber e Skoberne, 1989).

In Italia è scarsamente presente nelle regioni settentrionali ed è ancor meno presente in Toscana e nel Lazio (Pignatti, 1982; Fig. 44).

H. palustris è specie acquatica circumneutrale propria di habitat relativamente poco profondi, con alcalinità da bassa a moderata, da meso- ad eutrofici, con acqua da stagnante a flusso lento, con un contenuto moderato in fosfati e nitrati (Haslam, 1978). E' nota di suoli composti di sabbia, fango fluviale o torba con un basso tenore di carbonati ed alto di fosfati (Vermeersch e Triest, 2006). Sebbene la specie preferisca sistemi di acqua dolce aperti e soleggiati, può vivere anche nel sottobosco

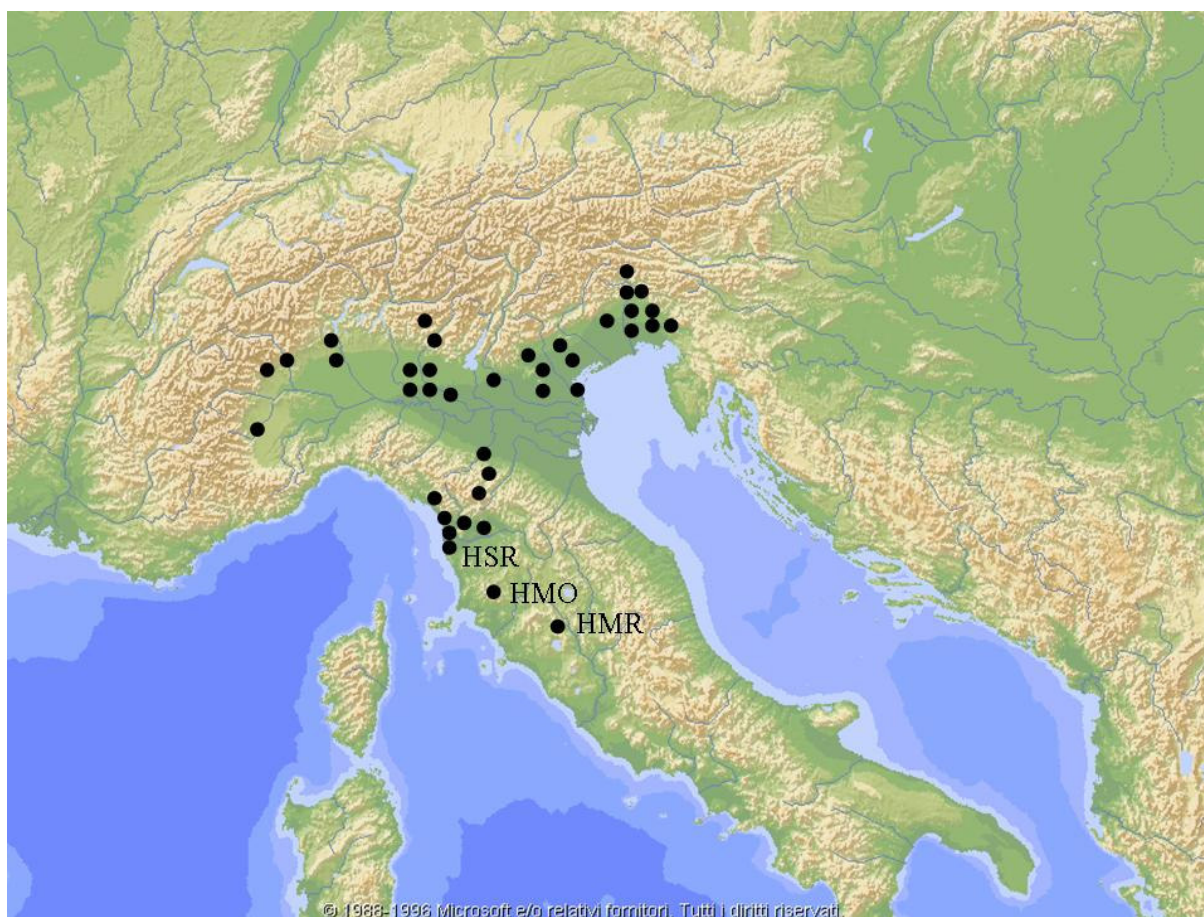


Fig. 44. *Hottonia palustris* in Italia e località di campionamento: San Rossore, Pisa (HSR); Laghetto di Montieri, Grosseto (HMO); Riserva Naturale di Monterufeno, Viterbo (HMR).

Umido (Brock *et al.*, 1989). Tale condizione, almeno in Italia, provoca una fioritura scarsa o assente delle piante (oss. pers.).

Nelle Figg. 45-49 vengono mostrati gli ambienti, in cui sono state ampionate le popolazioni studiate.

Nel nostro paese le popolazioni di *H. palustris* sono diminuite specialmente nell'ultimo secolo, come testimoniano dati di letteratura (ad esempio Borghesio, 2004, per la Riserva Naturale Orientata della Vauda in Piemonte) e di erbario, e ciò soprattutto a causa della diminuzione dell'habitat idoneo.

Le bonifiche di paludi e zone umide e l'inquinamento delle acque hanno giocato un ruolo fondamentale. Le stazioni più meridionali dell'areale stanno via via scomparendo: le diverse stazioni segnalate da Béguinot (1935) per le paludi pontine prima della bonifica (Paludi di Orgalicino, canale Selcella, presso il lago di Caprolace e dei Monaci, piscina di Zaffasio, presso Terracina, palude presso il fiume Uffente); quelle nella Riserva Naturale di Monterufeno, nel Lazio settentrionale, dove ad oggi risulta in forte riduzione. Diverse località segnalate in Toscana non ospitano più questa specie (accertamento sul campo), anche se spesso si tratta di zone protette in vario grado (aree naturali protette di interesse locale, riserve, parchi). Inoltre, in queste ultime si è notato spesso una fioritura di altre specie (*Ranunculus aquatilis*, *Phragmites australis*, ecc.) che competono con successo per lo spazio, per la luce e i nutrienti, escludendo facilmente l'*Hottonia* e relegandola ai margini scarsamente soleggiati o in ombra delle raccolte d'acqua. In tali situazioni le piante di *Hottonia* si riproducono prevalentemente per via clonale, poiché con scarsa illuminazione la fioritura risulta, come si è detto, scarsa o assente.

Secondo il Libro Rosso delle Piante d'Italia (Conti *et al.*, 1992) *H. palustris* è specie vulnerabile in tutta Italia.

Anche nel resto dell'Europa si osserva la rarefazione delle popolazioni dovuta principalmente a bonifiche e drenaggio delle acque; ad esempio, in Belgio (Vermeersch e Triest, 2006), nell'area nord-orientale (Stepień, 2008) e centrale (Kurowski, 2007) della Polonia, nell'alta valle del Reno (Pretzell e Reif, 1999), nell'area di Vienna in Austria (Baart *et al.*, 2006).



Fig. 45. Raccolta d'acqua (lama) presso la Tenuta di San Rossore, Pisa (Toscana) (Foto: U.A. Olmati).



Fig. 46 *Hottonia palustris*: (a) fusto e foglie galleggianti sotto la superficie dell'acqua; (b) forma terrestre che cresce sul bordo della raccolta d'acqua (Foto: U.A. Olmati e C. Olmati).

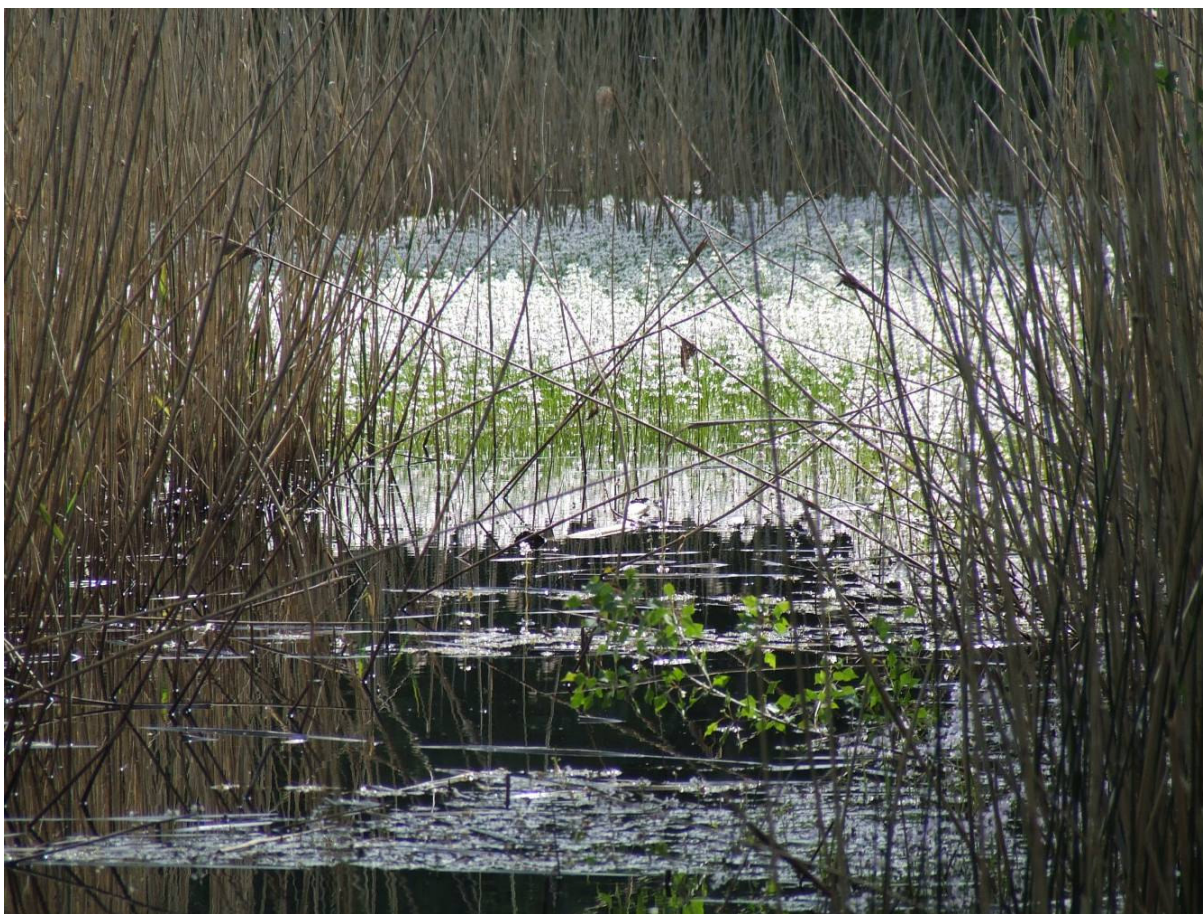


Fig. 47. Fioritura primaverile di *Hottonia palustris* presso il Laghetto di Montieri, Grosseto (Toscana) (Foto: E.A. Olmati).



Fig. 48. Raccolta d'acqua (troscia) in via di interrimento presso la Riserva Naturale Monterufeno, Aquapendente, Viterbo (Lazio) (Foto: C. Olmati).



Fig. 49. *Hottonia palustris* : (a), (b) individui circondati da altre specie vegetali che competono con successo per lo spazio, la luce e i nutrienti (Foto: C. Olmati).

3.2. Test di germinazione e riproduzione *in vitro*: risultati

Sono stati utilizzati semi provenienti da individui della popolazione di *H. palustris* presente all'interno della Riserva Naturale di Monterufeno (Acquapendente, Viterbo). I semi raccolti da un numero limitato di piante durante la primavera del 2007 sono stati conservati in una camera di deidratazione (15-20 % umidità relativa; 15°C) fino al momento della prove di germinazione (agosto 2009).

I semi di *H. palustris* hanno germinato entro 60 giorni dalla semina in ogni trattamento.

I risultati dei test effettuati sono riportati nella Tab. 23 e in Fig. 50 sono riportate le microfotografie, scattate allo stereomicroscopio, delle fasi di germinazione *in vitro*.

La percentuale di germinazione osservata nel campione di controllo (HP 0h) è del 6,3%, mentre percentuali del 20,8% e del 12,5% sono state osservate per i semi immersi in acqua distillata, rispettivamente per 24 (HP 24h) e 48 ore (HP 48h). Infine, per i semi trattati con gibberelline (HP-GA₃) la percentuale di germinazione è stata del 16,7%. L'analisi statistica di tali dati ha mostrato una differenza significativa solo tra il campione di controllo (HP 0h) e il campione HP 24h ($P < 0.005$; test t di Student, Tab. 24).

I semi del campione di controllo (HP 0h) hanno mostrato tempi di germinazione lunghi così come i semi immersi in acqua distillata (HP 24h e HP 48h), mentre i semi trattati con gibberelline (HP-GA₃) hanno germinato in tempi brevi, come illustrato dai valori di T_{50} (Tab. 23, Fig. 51) e dalle curve di germinazione (Fig. 52).

Le percentuali di germinazione ottenute da questi esperimenti mostrano alcune discrepanze rispetto a quelle ottenute sia per *H. palustris* da Brock *et al.* (1989) che per *H. inflata* da Baskin *et al.* (1996). Tali differenze sono verosimilmente imputabili all'applicazione di protocolli diversi; non è, tuttavia, da escludere una minore vitalità dei semi utilizzati, provenienti da una popolazione con assenza di diversità genetica per i marcatori studiati, e geneticamente erosa (vedi paragrafo successivo).

Tab. 23. Percentuali di germinazione e fasi di sviluppo successive per *H. palustris*. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; T₅₀: numero di giorni necessari per la germinazione del 50% dei semi; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 60 giorni dalla semina. S.D.: deviazione standard.

Sigla	Pre-trattamento	G (media±S.D.)	T ₅₀ (giorni)	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (media±S.D.)
HP 0h (controllo)	---	6.3 ± 2.4	20.0	75.0 ± 29.0	100.0	100.0
HP 24h	imbibizione in H ₂ O dist per 24 h a 25°C	20.8 ± 4.2	15.8	91.7 ± 14.4	100.0	100.0
HP 48h	imbibizione in H ₂ O dist per 48 h a 25°C	12.5 ± 4.2	29.5	91.7 ± 14.4	100.0	100.0
HP-GA ₃	gibberelline (GA ₃ , 250mg/l) nel mezzo di germinazione	16.7 ± 11.0	8.7	100.0	100.0	37.3 ± 11.2



Fig. 50. Fasi della germinazione *in vitro* di *Hottonia palustris* L. (a) germinazione ($\times 0.8$); (b) cotiledoni ($\times 0.8$); (c) prima coppia fogliare ($\times 0.8$); (d) plantule ($\times 0.8$); (f) piantine trasferite in contenitori di plastica contenenti terreno sterile dopo 4-5 settimane di cultura (Foto: C. Olmati).

Tab. 24. Matrice che mostra i livelli di significatività (test t di Student) per le differenze nei confronti a coppia delle percentuali di germinazione (G, sotto la diagonale) e delle percentuali di plantule sopravvissute dopo 60 giorni dalla semina (S, sopra la diagonale) in *Hottonia palustris*. HP 0h: controllo; HP 24h e HP 48h: immersione in acqua distillata per 24 e 48 ore; HP-GA₃: trattamento con gibberelline (GA₃, 250mg/l). *: 0.01 < P < 0.001; **: P < 0.001; n.s.: non significativo.

G \ S				
	HP 0h	HP 24h	HP 48h	HP-GA ₃
HP 0h	----	n.s.	n.s.	**
HP 24h	*	----	n.s.	**
HP 48h	n.s.	n.s.	----	**
HP-GA ₃	n.s.	n.s.	n.s.	----

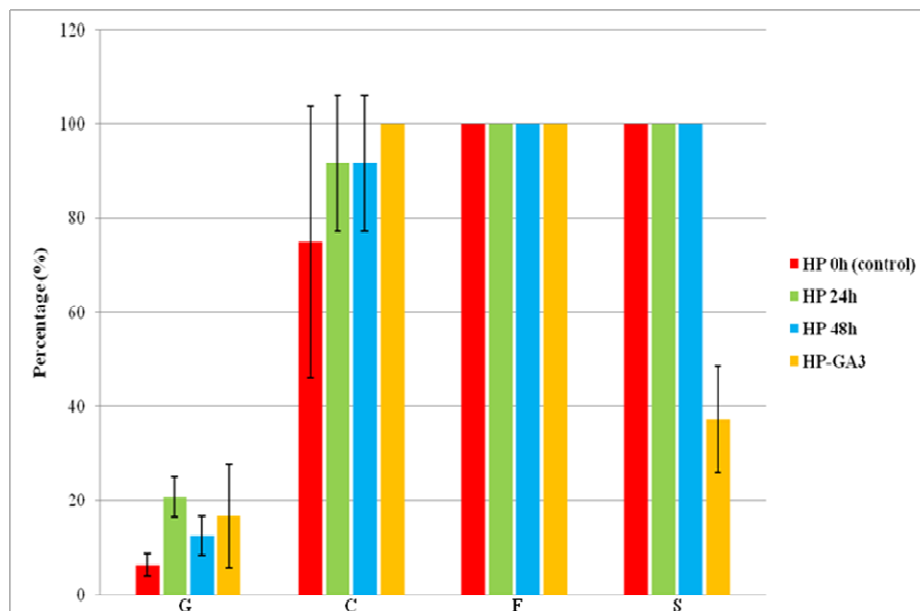


Fig. 51. Percentuali di germinazione e fasi di sviluppo successive per *H. palustris*. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 60 giorni dalla semina. HP 0h: controllo; HP 24h e HP 48h: imbibizione in acqua distillata per 24-48 ore a temperatura ambiente (25°C); HP-GA₃: gibberelline (GA₃, 250mg/l) nel mezzo di germinazione. Le linee verticali indicano la deviazione standard.

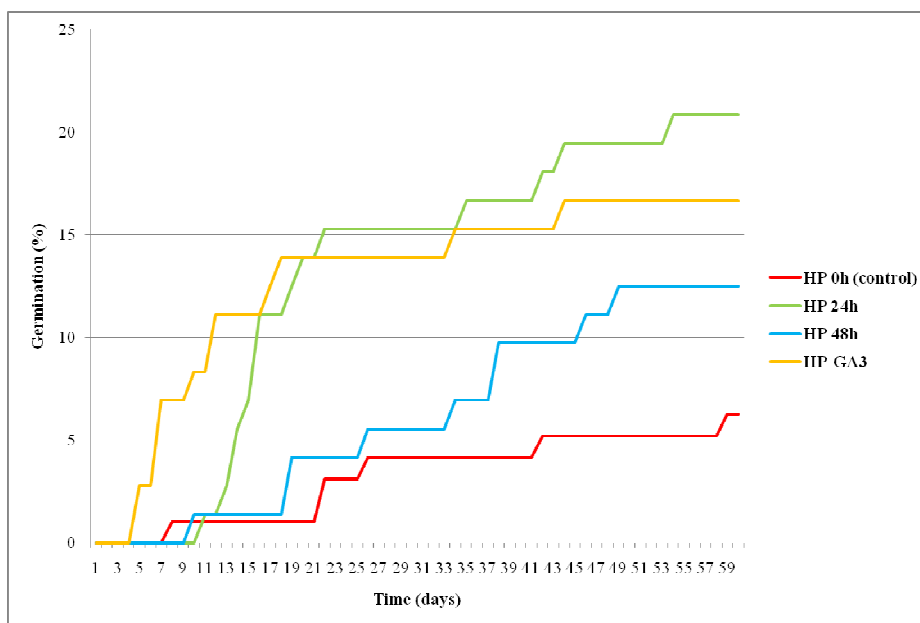


Fig. 52. Andamento nel tempo della germinazione dei semi di *H. palustris* dopo tre trattamenti. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$). HP 0h: controllo; HP 24h e HP 48h: imbibizione in acqua distillata per 24-48 ore a temperatura ambiente (25°C); HP-GA₃: gibberelline (GA₃, 250mg/l) nel mezzo di germinazione.

La percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni è stata elevata per tutti i campioni (75.0% - 100%).

Lo stesso risultato è stato osservato per la percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare (100%).

Il tasso di sopravvivenza delle piante trasferite su terriccio è stato del 100%, sia per il campione di controllo (HP 0h) che per i semi immersi in acqua distillata (HP 24h e HP 48h).

Di contro, la percentuale di piante ottenute da semi trattati con gibberelline (HP-GA₃) è stata bassa (37,3%) e significativamente diversa ($P < 0,005$; test t di Student) se confrontata con gli altri campioni. L'impiego di gibberelline permette in molti casi di rompere la dormienza dovuta alla fotosensibilità positiva dei semi. Tuttavia, applicando questo metodo di coltura, non tutte le piante sono riuscite ad accrescersi (eziolamento dovuto all'impiego di ormoni).

Da questi esperimenti è emerso che la riproduzione da seme di *H. palustris* è un metodo praticabile che non necessita di strumenti e tecniche particolari.

Alcune delle piante ottenute durante le prove di germinazione sono state utilizzate per i test genetici, mentre i rimanenti individui sono attualmente conservati in una camera climatica presso la Banca del Germoplasma dell'Orto Botanico della Tuscia (Università della Tuscia, Viterbo - Italia).

3.3. Ricerche popolazionistiche e genetiche in *Hottonia palustris*: risultati

Le popolazioni di *Hottonia palustris* studiate provengono da:

- dintorni di Hengelo, Overijssel (Paesi Bassi): sigla HHE (Fig. 53);
- Tenuta di San Rossore, Pisa (Toscana): sigla HSR (Fig. 44);
- Riserva Naturale di Monterufeno, Acquapendente (Lazio settentrionale): sigla HMR (Fig. 44);
- Laghetto di Montieri, Grosseto (Toscana): sigla HMO (Fig. 44).

Sono stati studiati i seguenti quattordici loci (tra parentesi l'enzima codificato e il numero di codice): *Skdh* (Scichimico deidrogenasi, EC 1.1.1.25); *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4* (Malato deidrogenasi NAD⁺ dipendente, E.C. 1.1.1.37); *Mdhp* (Malato deidrogenasi NADP⁺ dipendente, E.C. 1.1.1.40); *Idh-1*, *Idh-2* (Isocitrato deidrogenasi, E.C. 1.1.1.42); *6Pgdh-1* (6-Fosfogluconato deidrogenasi, E.C. 1.1.1.44); *NADHdh* (NADH deidrogenasi, EC 1.6.99.3); *Ugpp-1*, *Ugpp-2* (Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfatasi, E.C. 2.7.7.9); *Pgm-1*, *Pgm-2* (Fosfoglucomutasi, E.C. 5.4.2.2). Per le tecniche utilizzate vedi Tabb. 8, 10.

Gli alleli sono stati indicati nel modo seguente: l'indice 100 è stato attribuito all'allele più comune nel campione di *H. palustris* proveniente dal Laghetto di Montieri; indici maggiori (o minori) sono stati dati agli altri alleli, a seconda della loro mobilità elettroforetica crescente (o, rispettivamente) decrescente rispetto all'allele 100.

Le frequenze alleliche ai 14 loci studiati vengono riportate in Tab. 25.

Non sono state osservate deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ai loci polimorfici (test del χ^2 , $P > 0.01$).

Undici loci sono risultati monomorfici in tutti i campioni studiati (*Skdh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*, *Mdhp*, *Idh-2*, *NADHdh*, *Ugpp-1*, *Ugpp-2*, *Pgm-1*).

Dei rimanenti tre loci, la frequenza degli alleli diversi dal più comune (100) è del 7-8%, tranne in un caso dove l'allele *Pgm-2*¹⁰⁵ raggiunge una frequenza del 31% nel campione di San Rossore.

I valori medi di variabilità genetica vengono dati in Tab. 26.



Fig. 53. Località di provenienza del campione olandese studiato di *Hottonia palustris*: dintorni di Hengelo (HHE).

Tab. 25. Frequenze alleliche di *Hottonia palustris* dell'Italia centrale e dei Paesi Bassi su 14 loci studiati. Per le sigle vedi Tab. 2.

	<i>Hottonia palustris</i>			
	Toscana		Lazio	Paesi Bassi
	HSR	HMO	HMR	HHE
<i>Skdh</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Mdh-1</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Mdh-2</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Mdh-3</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Mdh-4</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Mdhp</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Idh-1</i>				
100	1.00	1.00	1.00	0.93
106	---	---	---	0.07
<i>Idh-2</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>6Pgdh-1</i>				
100	0.92	0.86	1.00	0.93
104	0.08	0.07	---	---
108	---	0.07	---	0.07
<i>NADHdh</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Ugpp-1</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Ugpp-2</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pgm-1</i>				
100	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pgm-2</i>				
100	0.69	1.00	1.00	0.93
105	0.31	---	---	0.07

Tab. 26. Parametri di variabilità genetica in quattro campioni di popolazioni di *Hottonia palustris* provenienti dall'Italia centrale e dai Paesi Bassi, calcolati su 14 loci. *A*: numero medio di alleli per locus; P_{99} , P_{95} : proporzione di loci polimorfici con il criterio dello 0.99 e dello 0.95, rispettivamente; H_o : eterozigosi media osservata; H_e : eterozigosi media attesa, calcolata secondo Nei (1978). In parentesi la deviazione standard.
Per le sigle vedi Tab. 2.

Popolazione	<i>A</i>	P_{99}	P_{95}	H_o	H_e
HSR	1.2 (0.20)	0.14	0.14	0.080 (0.055)	0.062 (0.042)
HMO	1.1 (0.10)	0.07	0.07	0.020 (0.020)	0.019 (0.019)
HMR	1.0 (0.00)	0.00	0.00	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
HHE	1.2 (0.10)	0.21	0.21	0.031 (0.016)	0.031 (0.016)

Questi risultano tutti molto bassi: il numero medio di alleli per locus (A) è compreso tra 1,0 (Monte Rufeno) e 1,2 (San Rossore, Toscana e Hengelo, Paesi Bassi); la percentuale di loci polimorfici calcolata sia con il criterio del 99% (P_{99}) che con quello del 95% (P_{95}) risultano uguali e compresi tra 0 (Monte Rufeno) e 0,21 (Paesi Bassi); sia l'eterozigosi media osservata per locus (H_o) che quella attesa (H_e) risultano comprese tra 0 (Monte Rufeno) e 0,08 (San Rossore, Toscana), con lievi differenze per gli altri campioni. La popolazione di San Rossore mostra l'eterozigosi più elevata, mentre quella di Monterufeno è monomorfica. Il campione proveniente dai Paesi Bassi ($A = 1,2$; $P_{99} = 0,21$; $H_o = 0,03$; $H_e = 0,03$) mostra un livello di polimorfismo di poco superiore alle popolazioni italiane ($A = 1,1$; $P_{99} = 0,07$; $H_o = 0,03$; $H_e = 0,03$).

La variabilità della popolazione olandese di *H. palustris* è solo di poco maggiore di quella italiana di San Rossore; il numero medio di alleli è lo stesso: 1,2, il polimorfismo (criterio del 95%) è un po' più elevato nella popolazione olandese (21%, contro il 14% della popolazione di San Rossore), mentre l'eterozigosi media attesa per locus è inferiore in Olanda (0,03) che a San Rossore (0,06), in rapporto ai fenomeni di inbreeding maggiori nella popolazione olandese, assai meno numerosa di quella di San Rossore. D'altra parte il più elevato polimorfismo di tale piccola popolazione rispetto alle tre italiane indica, come si è detto, che in Olanda la diversità genetica di *H. palustris* è maggiore, in rapporto alla situazione demica più favorevole in questo paese (Klijn e Witte, 1999).

La stima del flusso genico medio tra le popolazioni italiane studiate è $Nm = 1.13$. $Nm = 1$ viene considerata la soglia al di sotto della quale il differenziamento genetico tra popolazioni conspecifiche avviene per deriva genetica, in assenza di selezione (Wright, 1931). Il valore di flusso genico ottenuto per le popolazioni italiane di *H. palustris* non è in contrasto con l'assenza di fenomeni di deriva osservabili: nonostante l'areale sia effettivamente frammentato (distanze relativamente grandi e soprattutto barriere di tipo ecologico separano la maggior parte delle popolazioni), è presente (o è stato presente fino a tempi relativamente recenti)

un certo livello di migrazione tale da consentire l'omogeneità genetica da noi osservata.

Le distanze genetiche (Tab. 27) calcolate secondo Nei (1972) mostrano valori molto bassi; in particolare, in Italia la distanza media tra popolazioni è $D = 0,007$, e a ciò contribuisce maggiormente la popolazione di San Rossore, quella più settentrionale studiata, che mostra una maggiore diversità. La popolazione olandese ha una distanza di poco inferiore con le popolazioni italiane ($D = 0,003$).

Tab. 27. Matrice delle distanze genetiche (sotto la diagonale) e delle identità genetiche (sopra la diagonale) tra campioni di popolazioni di *Hottonia palustris* provenienti dall'Italia centrale e dai Paesi Bassi, calcolati sulla base di 14 loci con la formula di Nei (1972). Per le sigle vedi Tab. 2.

Popolazione	HSR	HMO	HMR	HHE
HSR	----	0.992	0.989	0.994
HMO	0.008	----	0.999	0.999
HMR	0.011	0.001	----	0.999
HHE	0.006	0.001	0.001	----

CAPITOLO 4

RICERCHE SULLA GERMINAZIONE *IN VITRO* E SULLA STRUTTURA GENETICA DI *PRIMULA PALINURI*

4.1. Introduzione

Primula palinuri Petagna, 1787 (Fig. 54), è uno stenoendemismo ad areale relitto. Appartiene al sottogenere *Auriculastrum* e alla sezione *Auricula*.

Alcuni autori hanno considerato questa specie un endemismo paleogenico (Fiori, 1908; Negri, 1928), altri neogenico (Vaccari, 1938; Guadagno, 1931-32; Lüdi, 1926; Buscalioni e Muscatello, 1912-14).

Per Chiarugi (1955) *P. palinuri* sarebbe un elemento paleoequatoriale relitto di una flora anteriore all'orogenesi alpina. Quest'autore riteneva, a torto, che il cariotipo di *P. palinuri* fosse $2n = 44$ (numero base 22); le altre specie del gruppo *Auricula* avrebbero avuto un numero cromosomico uguale a 62 (numero base 31). Sulla base di tali considerazioni, rivelatesi erranee, Chiarugi ipotizzò un'origine del gruppo *Auricula* a partire dall'ibridazione di una specie *P. palinuri*-like con una (ad esempio, della sezione *Farinosae*) a numero base 9 ($22 + 9 \rightarrow 31$).

Più recentemente Zhang *et al.* (2004), basandosi sui tassi di sostituzione negli spaziatori intergenici ITS, hanno sostenuto che la sezione *Auricula* avrebbe avuto origine nel Pliocene, circa 3,6 milioni di anni fa. All'inizio del Pleistocene, circa 2,4 milioni di anni fa, si sarebbe verificata, secondo questi autori, la diversificazione di tale sezione nelle due sottosezioni, *Euauricula* e *Cyanopsis*, con distribuzione geografica rispettivamente occidentale e orientale.

Oggi sappiamo, grazie soprattutto alle ricerche sul DNA cloroplastico di Mast *et al.* (2004), che la sezione *Auricula*, inclusa *P. palinuri*, il sottogenere *Auriculastrum* con le sezioni *Suffrutescens*, *Parryi* ed *Auricula* e l'intero genere nord-americano *Dodecatheon* hanno nel loro genoma poliploide un pool genico *cuneifolia*-like e che sono derivate da antenati diploidi simili all'attuale *P. cuneifolia* (sezione *Cuneifolia*, l'unica diploide del sottogenere *Auriculastrum*).

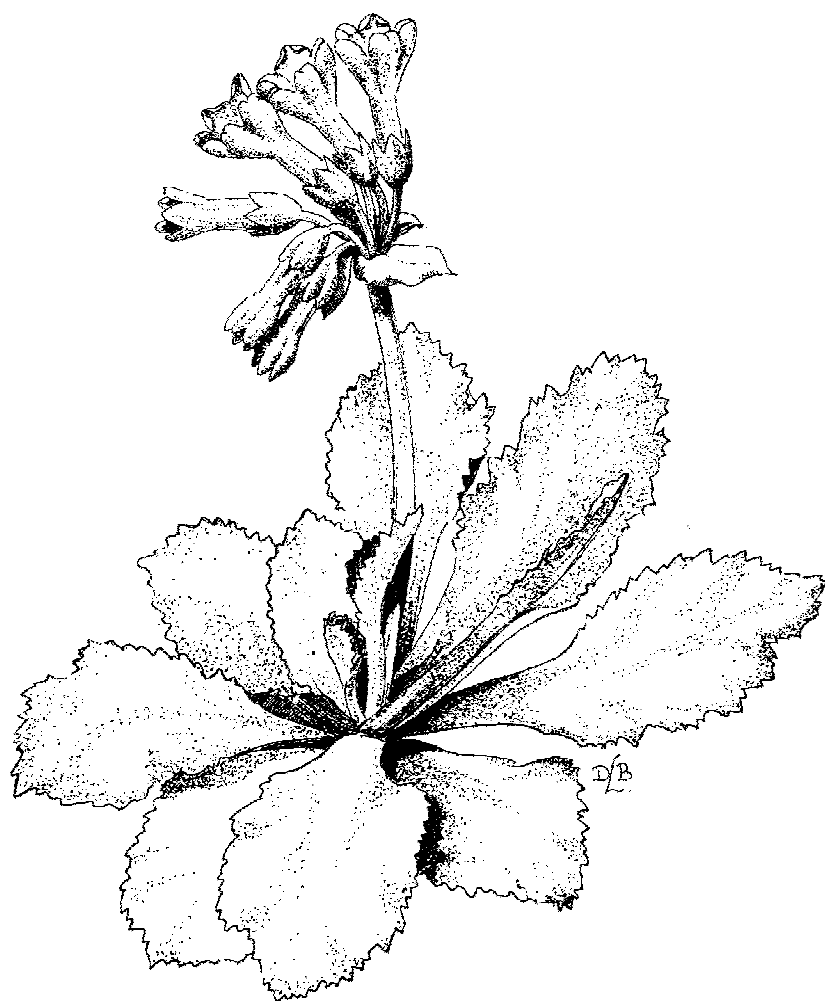


Fig. 54. *Primula palinuri* (Smith *et al.*, 1984).

Attualmente gli unici due membri viventi della sezione *Cuneifolia* sono *P. cuneifolia* e l'endemismo giapponese *P. nipponica*. Le specie poliploidi del sottogenere *Auriculastrum* e del genere *Dodecatheon*, originate tutte, come si è detto, da antenati diploidi *cuneifolia*-like, non si trovano mai in sympatria con la diploide *P. cuneifolia*, avendone provocato per competizione l'estinzione in tutte le regioni ove le specie poliploidi si sono diffuse. L'unica eccezione è rappresentata da *P. cuneifolia saxifragifolia*, taxon omostile che in Alaska e nel Canada nord-occidentale può trovarsi sia pure raramente con il poliploide *Dodecatheon frigidum*. Quanto alle specie tetraploidi del sottogenere *Auriculastrum* e del genere *Dodecatheon*, esse non presentano attualmente zone di sympatria con le specie esaploidi della sezione *Auricula*.

La sezione *Auricula*, cui come abbiamo visto, *P. auricula* appartiene, si è differenziata nelle Alpi, che rappresentano il centro di diversità e di irraggiamento del gruppo; dalla catena alpina specie e sottospecie di questa sezione hanno colonizzato varie catene montuose dell'Europa centro-meridionale: Appennini, Cantabrigi, Pirenei, Alpi Francesi, Alpi Svizzere, Alpi Austriache, Tauri, Alpi della Baviera, Foresta Nera, Alpi Dinariche, Caravanche, Carpazi, Monti Tatra, Sudeti, Rodopi, Monti Rila, ecc. (la maggior parte delle specie della sezione *Auricula*, più di venti su meno di trenta in totale, è tuttora presente sulla catena alpina).

P. palinuri è attualmente presente sulle coste della Campania meridionale, della Basilicata e della Calabria settentrionale (Fig. 55), a non più di 300 metri dal mare e a quote non superiori ai 200 metri. *P. palinuri* si osserva a Capo Palinuro (Petagna, 1871; Porta, 1879; Gelmi, 1894), a Punta Caina, a Marina di Maratea (Basilicata), sullo scoglio di Fiuzzi presso Praia a Mare (Longo, 1901), sull'Isola di Dino (Pizzolongo, 1963; La Valva e Ricciardi, 1976-1977) e a Capo Scalea (Ricciardi, 1971). Le popolazioni campane di *P. palinuri* sono incluse nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, creato nel 1991, che l'ha scelta come specie bandiera (*flag species*).



Fig. 55. Località di raccolta dei campioni di *Primula palinuri* studiati: Capo Palinuro (PP); Marina di Camerota (PC); Punta degli Infreschi (PI); Vallone del Marcellino (PV); dintorni di Maratea (PM); Isola di Dino (PD).

Sulla costa salernitana popolazioni di *P. palinuri* sono state osservate sulle rupi della Calata della Molpa; presso l'Arco Naturale (Porta, 1879); ai margini della strada che dal porto di Palinuro conduce al paese (Arata, 1938); sugli scogli presso la foce del fiume Mingardo (Hofmann in Spanowsky e Casper, 1959); su arenarie friabili dall'*Antiquarium* di Palinuro fino al porticciolo, su rupi calcaree presso il fortino ad ovest del porto (Honsell e Pizzolongo, 1961) (Fig. 56, 57); su pareti rocciose calcaree presso il faro di Capo Palinuro (Honsell e Pizzolongo, 1961); su pareti costiere presso la Grotta dell'Inferno (Scario) (Moggi, 1970); a sud del fiume Mingardo, su pareti rocciose del Monte S. Antonio nei pressi di Cala del Cefalo e di Cala Finocchiara (Ricciardi, 1971); a Marina di Camerota, su rupi marittime nel tratto compreso tra la spiaggia di Lentiscella e il Vallone del Marcellino (Ricciardi, 1971).

Sulla costa di Potenza *P. palinuri* è presente presso Punta Caina (Maratea) su lastroni verticali esposti a nord e a nord-ovest e speroni rocciosi ai bordi della Strada Statale Tirrena Inferiore (Ricciardi, 1971).

Sulla costa settentrionale calabra *P. palinuri* si osserva sullo scoglio di Fiuzzi (Praia a Mare, Longo, 1901); è molto numerosa sull'Isola di Dino (Fig. 58), di fronte a Praia a Mare, ove si osserva sia sulle rupi (Pizzolongo, 1963), sia nella macchia (La Valva e Ricciardi, 1976-1977).

E' noto che le piante rare che crescono in prossimità del mare non hanno spesso specie affini alofile. Sono piante relativamente euriecie, ma cattive competitori (Griggs, 1914, 1940). La loro tolleranza (non preferenza) a concentrazioni elevate di NaCl nei substrati su cui crescono e nella bassa atmosfera, legata al frangersi delle onde marine, diminuisce drasticamente il numero dei potenziali competitori. E' il caso di *P. palinuri*, che attualmente è presente solo in una fascia discontinua di costa rocciosa, e a tratti franosa, dalla Campania meridionale alla Calabria settentrionale, lunga in tutto circa 90 chilometri, a non più di 300 m del mare e a non più di 200 m di quota.



Fig. 56. Capo Palinuro (Campania meridionale), *patria typica* di *Primula palinuri*, stenoendemismo della costa tirrenica meridionale (Foto: C. Mosco).



Fig. 57. Individui di *Primula palinuri* a Capo Palinuro, *patria typica* della specie (Foto: C. Mosco).

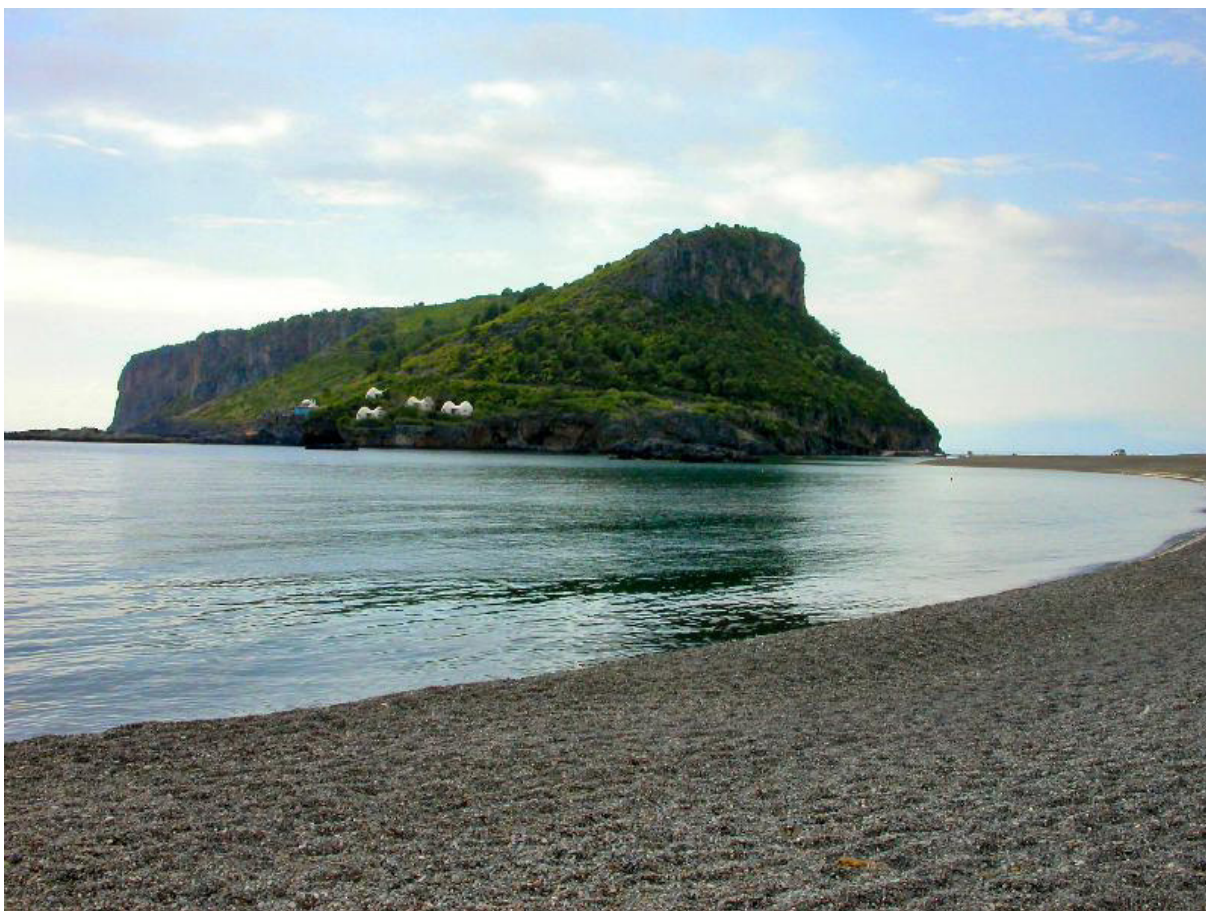


Fig. 58. L'isola di Dino, di fronte a Praia a Mare (Calabria settentrionale), ove vive la popolazione più numerosa ed integra di *Primula palinuri* (Foto: C. Mosco).



Fig. 59. Due piante di *Primula palinuri* in dormienza estiva su una parete rocciosa di arenaria nei pressi di Capo Palinuro (Campania meridionale) (Foto: L. Garofalo).

P. palinuri predilige esposizioni a nord, temperature fresche e una notevole umidità; durante l'estate sopporta, tuttavia, temperature elevate e una forte siccità, cui si adatta grazie alla dormienza estiva facoltativa (in luoghi freschi, infatti, tale fenomeno non si realizza). D'inverno *P. palinuri* sopravvive a periodi relativamente freddi e, trapiantata in regioni più settentrionali, ha mostrato di poter superare lunghi periodi sotto alti strati di neve senza esserne danneggiata.

P. palinuri cresce nelle fessure delle rupi costituite da calcari e dolomie esposte a nord, nord-ovest e talvolta a nord-est (Ricciardi, 1971); lo scarso terreno che si accumula nelle fenditure di tali rocce è generalmente umido e povero di humus, a pH neutro o leggermente acido (Pizzolongo, 1963). Nelle stazioni che si trovano sulla spiaggia del porto di Palinuro, *P. palinuri* cresce su arenaria friabile (Fig. 59, Pizzolongo, 1963).

Le foglie di *P. palinuri* hanno scarsa cutinizzazione e stomi numerosi; il mesofillo è mucillaginoso, con abbondanti sostanze pectiche (Pizzolongo, 1963). L'antesi dei fiori di *P. palinuri* è precoce, inizia in febbraio e dura circa 40 giorni (Fig. 60). Le capsule al momento della maturazione, intorno a giugno-luglio, si aprono e i numerosi semi oblunghi (1-1,5 mm) e lisci vengono dispersi dal vento. Le piante che crescono all'ombra, ad esempio, nella macchia dell'Isola di Dino, fioriscono raramente e si riproducono prevalentemente per via vegetativa, con stoloni superficiali anche più lunghi di mezzo metro. Nei mesi estivi la parte epigea della pianta si dissecca (*dormienza estiva*, Fig. 59).

Le falesie scoscese a picco sul mare, tipiche della costa cilentana, sono ricche di numerosi endemismi, spesso presenti nelle immediate vicinanze di *P. palinuri*, tra cui: *Dianthus rupicola*, *Centaurea cineraria*, *Iberis semperflorens*, *Campanula fragilis*, *Limonium remotispiculum*. Pizzolongo (1963) ha proposto un raggruppamento vegetale le cui specie caratteristiche sono *P. palinuri* e *Dianthus rupicola*. Anche La Valva (1976-1977) ha osservato che *P. palinuri*, nella vegetazione che popola le rupi dell'Isola di Dino, si accompagna quasi sempre a *Dianthus rupicola* e *Centaurea cineraria*. Brullo e Mercenò (1979) considerano invece *P. palinuri* come specie differenziale di una subassociazione (*primuletosum*



Fig. 60. Pianta di *Primula palinuri* che cresce in una fessura di roccia in antesi (Foto: M. Simeone).

palinuri) del *Centaureo-Campanuletum fragilis*, associazione descritta per le falesie tirreniche che si estendono dal Lazio alla Calabria.

P. palinuri è inclusa nel primo Red Book delle specie vegetali minacciate di estinzione (IUCN Red List of Threatened Plants, 1997). Nella Direttiva Habitat della Comunità Europea (1992) *P. palinuri* è considerata “specie prioritaria” ed è tutelata dalla Convenzione di Berna (1979). In Campania *P. palinuri* è protetta dalla Legge Regionale N°40 del 1994.

La principale minaccia alla sopravvivenza di *P. palinuri* è rappresentata dall'estensione estremamente ridotta del suo areale attuale, rappresentato, come si è visto, da una stretta, discontinua fascia costiera di circa 90 Km di lunghezza, larga non più di 300 m (distanza massima dal mare), sita su ripidi pendii con orientamento nord e nord-est. Tale areale è situato sulle coste della Campania meridionale, della Basilicata e della Calabria settentrionale, a quote non superiori ai 200 m, su suoli calcarei rocciosi, sassosi (e franosi), ma anche sabbiosi e umici. In tale fascia l'impatto antropico è soprattutto rappresentato, a partire dalla metà del novecento, dal turismo di massa, con edifici di vario tipo e diversa destinazione (ristoranti, alberghi, pensioni, residence, abitazioni private, strade, parcheggi, piccoli giardini, terrazze, belvederi, ecc.), strade costiere, ombrelloni, materassini, manufatti per la balneazione, l'attracco di natanti, ecc. (Fig. 61).

Inoltre alcune delle popolazioni di *P. palinuri* più integre, estese e con un più elevato numero di individui, si trovano attualmente al di fuori dei confini del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. L'ampliamento di tale Parco alla fascia costiera della Basilicata e della Calabria, almeno fino a Capo Scalea, e l'inclusione in esso dell'isola di Dino, di fronte a Praia a Mare, rappresenterebbero un'importante premessa per una più efficace protezione di *P. palinuri*. Purtroppo l'ampliamento del Parco appare oggi un'iniziativa tanto utile quanto ardua e forse irrealistica. Inoltre l'esperienza di questi ultimi decenni ha mostrato che la gestione delle popolazioni di *P. palinuri* all'interno del Parco è tutt'altro che soddisfacente. Perfino la popolazione

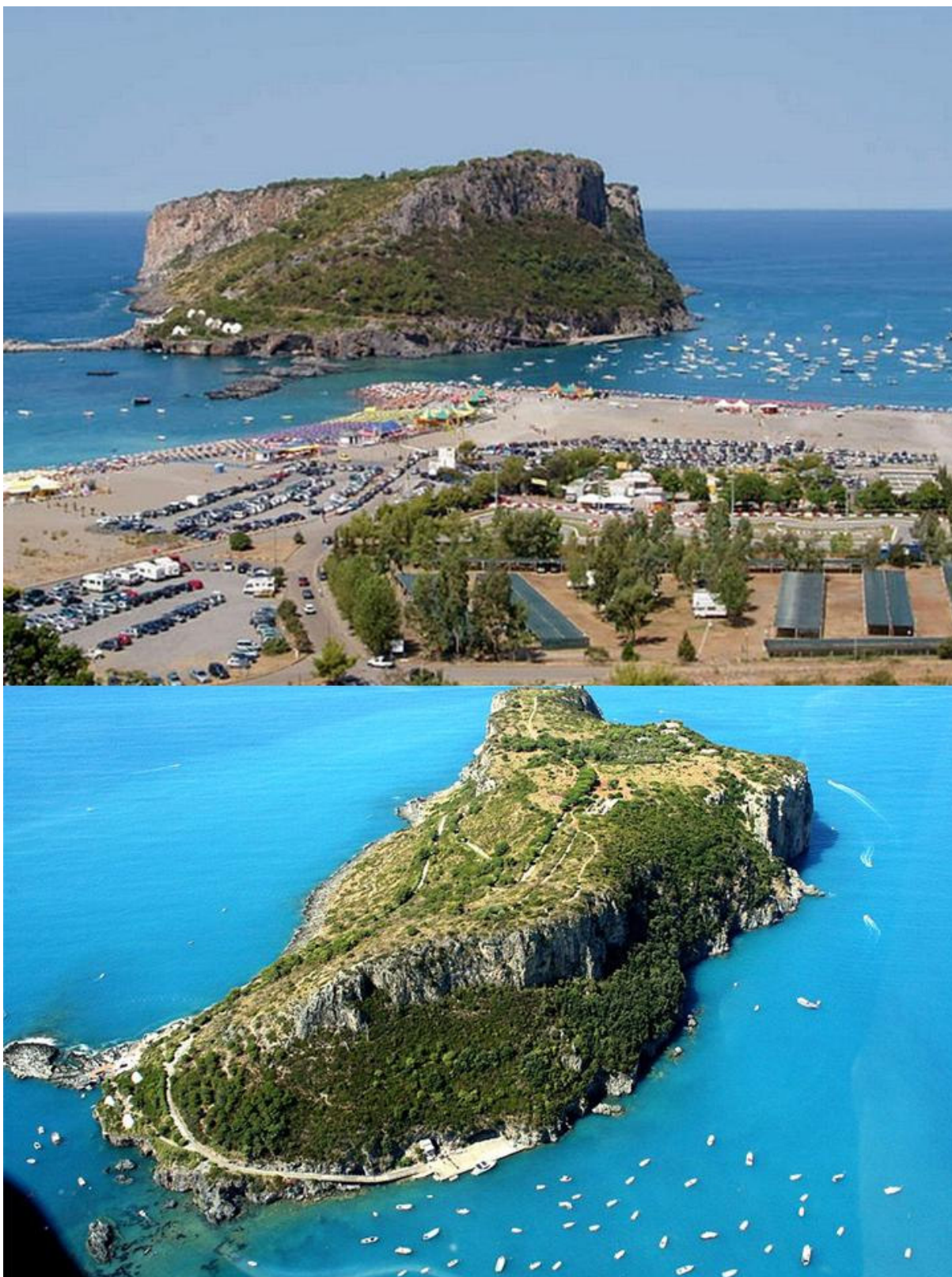


Fig. 61. Isola di Dino, di fronte a Praia a Mare (Calabria settentrionale): turismo balneare, natanti, ecc. minacciano la popolazione di *P. palinuri* più numerosa ed integra (Foto: C Mosco).

del *locus classicus* di *P. palinuri* sulla spiaggia del porto di Palinuro e sulle pareti rocciose e sui contrafforti prospicienti il porto è stata gravissimamente danneggiata e più che dimezzata nella sua consistenza numerica dall'ampliamento della strada di accesso al porto stesso, dalla costruzione di case, ristoranti e manufatti vari destinati alla balneazione, dalla presenza di ombrelloni, sdraie e materassini sempre più fitti, da natanti di vario tipo tirati in secco e dalla presenza pressoché stabile di un numero spesso molto elevato di turisti e bagnanti.

Primula palinuri è specie esaploide ($6x = 66$, numero base 11, Kress, 1989), come le altre della sezione *Auricula*, tra le poche eccezioni vanno ricordate alcune popolazioni di *P. marginata*, *P. minima*, *P. clusiana*, ecc., che presentano livelli più elevati di ploidia (per esempio $12x = 126$ in popolazioni di *P. marginata*; $18x = 198$ in popolazioni di *P. clusiana*, ecc.; Kress, 1963, 1989).

4.2. Test di germinazione e riproduzione *in vitro*: risultati

I semi di *P. palinuri* utilizzati sono stati prelevati da individui delle popolazioni di Capo Palinuro (Campania meridionale) e Isola di Dino (Calabria settentrionale) durante l'estate 2004 (circa 11 individui per Capo Palinuro e 26 per l'Isola di Dino).

I semi, una volta raccolti, sono stati mantenuti a temperatura ambiente per due anni e successivamente stoccati ad una temperatura di 4°C fino al gennaio 2010, momento in cui sono state effettuate le prove di germinazione per testare la loro vitalità. I semi di entrambe le popolazioni hanno germinato entro 50 giorni dalla semina.

I risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 28. e illustrati graficamente nelle Figg. 62, 63. Le microfotografie della germinazione *in vitro* di *P. palinuri*, scattate allo stereomicroscopio, sono mostrate in Fig. 64.

La percentuale di germinazione osservata per la popolazione di Capo Palinuro (PPP) è del 80,6% mentre invece la percentuale osservata per quella dell'Isola di Dino (PPD) è del 86,1%.

La germinazione dei semi è stata veloce per entrambi i campioni di semi, come illustrato dai valori di T_{50} (Tab. 28) e mostrato dalle curve di germinazione (Fig. 63).

La percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni è stata del 100% per entrambi i campioni di semi. Gli stessi risultati sono stati osservati per il numero di individui che hanno raggiunto la fase di prima coppia fogliare.

Infine, anche la percentuale di sopravvivenza osservata delle piante trasferite su terriccio è del 100% per entrambe le popolazioni.

L'analisi statistica (test t di Student, $P < 0,005$) non ha evidenziato differenze significative tra le due popolazioni studiate per i parametri calcolati.

In letteratura è presente un numero limitato di studi che trattano la germinazione *in vitro* di specie di *Primula* (McKee e Richards, 1998; Kery *et al.*, 2000; Cerabolini *et al.*, 2004; Guggisberg *et al.*, 2008).

Dati simili (tassi di germinazione compresi tra il 78% e il 100%) sono stati ottenuti da Cerabolini e collaboratori (2004) per *P. glaucescens*, specie anch'essa appartenente al gruppo *Auricula* e, come *P. palinuri*, allopoliploide.

Tab.28 . Percentuali di germinazione e fasi di sviluppo successive per *P. palinuri*. I semi sono stati raccolti a Capo Palinuro (PPP), Campania meridionale e Isola di Dino (PPD), Calabria settentrionale nell'estate del 2004. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; 20±1°C). G: percentuale di semi germinati; T₅₀: numero di giorni necessari per la germinazione del 50% dei semi; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravissute 50 giorni dopo la semina. S.D.: deviazione standard.

Sigla	Pre-trattamento	G (media±S.D.)	T ₅₀ (giorni)	C (media±S.D.)	F (media±S.D.)	S (mean±S.D.)
PPP	---	80.6 ± 21.0	8.0	100.0	100.0	100.0
PPD	---	86.1 ± 12.7	8.3	100.0	100.0	100.0

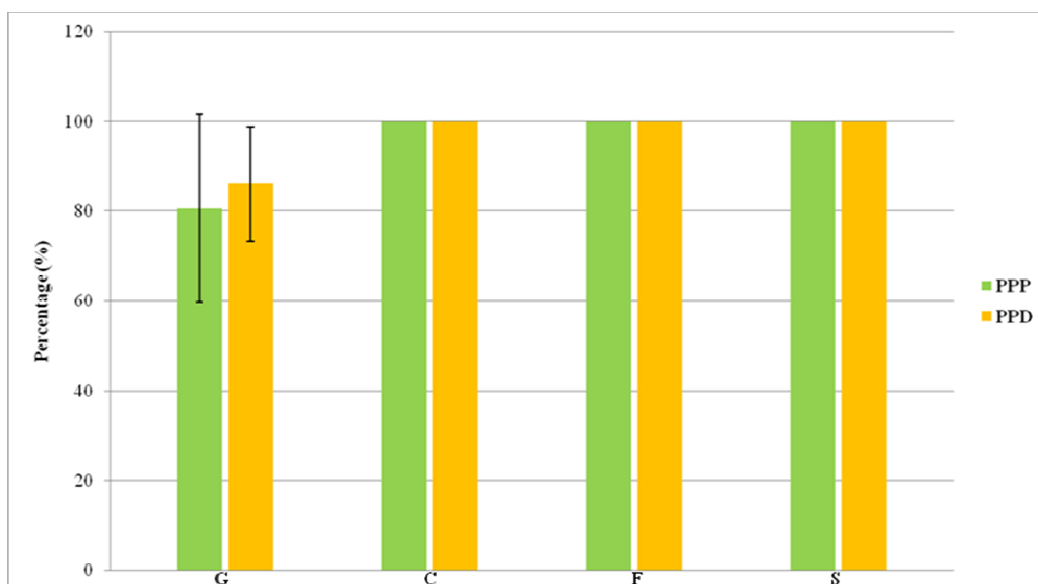


Fig. 62. Percentuali di germinazione e fasi di sviluppo successive dei semi di *P. palinuri* raccolti a Capo Palinuro (PPP), Campania meridionale e Isola di Dino (PPD), Calabria settentrionale, durante l'estate del 2004. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$). G: percentuale di semi germinati; C: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di cotiledoni; F: percentuale di individui che hanno raggiunto lo stadio di prima coppia fogliare; S: percentuale di plantule sopravvissute dopo 50 giorni dalla semina. Le linee verticali indicano la deviazione standard.

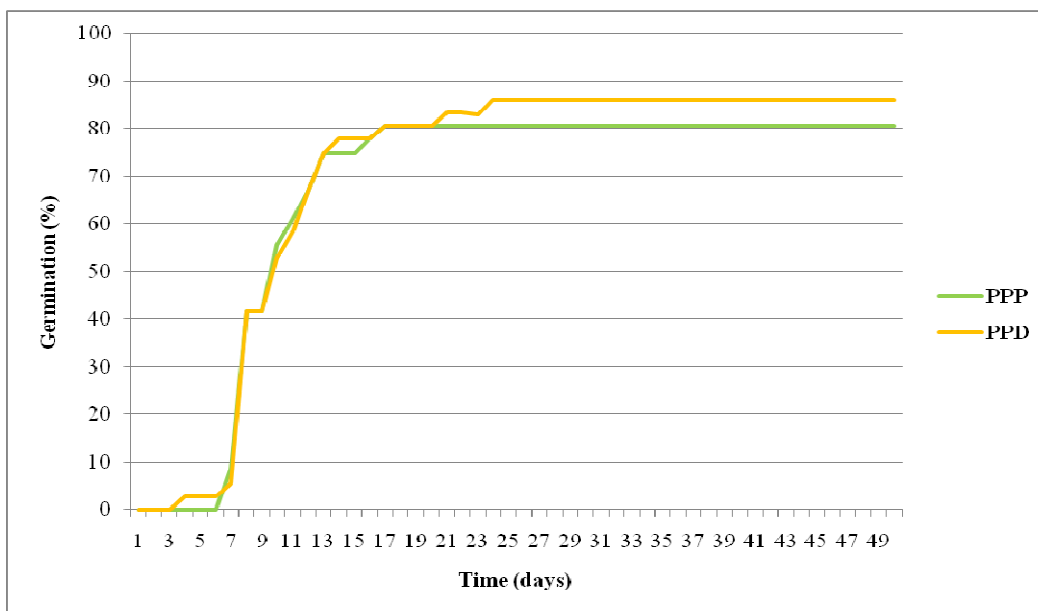


Fig. 63. Andamento nel tempo della germinazione dei semi di *P. palinuri*. I semi sono stati incubati a condizioni costanti (fotoperiodo 12/12h; $20\pm 1^\circ\text{C}$). PPP: semi raccolti a Capo Palinuro, Campania meridionale; PPD: semi raccolti a Isola di Dino, Calabria settentrionale.



Fig. 64. Fasi della germinazione *in vitro* di *Primula palinuri* : (a) germinazione ($\times 0.8$); (b) cotiledoni ($\times 0.8$); (c), (d) prima foglia ($\times 0.8$). (Foto: C. Olmati).

La propagazione da seme è un metodo praticabile per la conservazione *ex situ* di *Primula palinuri*.

La germinazione di *P. palinuri* in condizioni non sterili consente la propagazione da parte delle banche di semi e di giardini botanici senza l'uso di strutture specialistiche, senza l'impiego di personale altamente specializzato, né strumentazioni costose (Fig. 65).

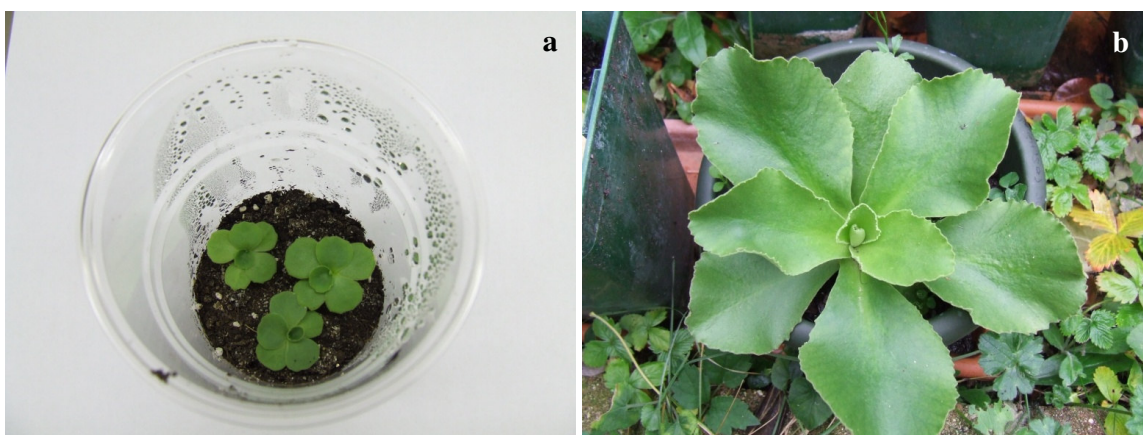


Fig. 65. *Primula palinuri* : (a) giovani piante dopo 5 settimane di coltura trasferite su terriccio; (b) pianta coltivata (Foto: C. Olmati).

4.3. Ricerche genetiche su *Primula palinuri*: risultati

Speciazione per ibridazione

L'origine geografica delle popolazioni di *Primula palinuri* studiate geneticamente, mostrate in Fig. 55, è la seguente:

- Capo Palinuro, Campania meridionale: sigla PP;
- Marina di Camerota, Campania meridionale: sigla PC;
- Punta degli Infreschi, Campania meridionale: sigla PI;
- Vallone del Marcellino, Campania meridionale: sigla PV;
- dintorni di Maratea, Basilicata: sigla PM;
- Isola di Dino, Calabria settentrionale: sigla PD.

Sono stati studiati i seguenti sette loci (tra parentesi l'enzima codificato e il numero di codice): *Mdh-2* (Malato deidrogenasi NAD⁺ dipendente, E.C. 1.1.1.37); *6Pgdh-2* (6-Fosfogluconato deidrogenasi, E.C. 1.1.1.44); *NADHdh-2* (NADH deidrogenasi, EC 1.6.99.3); *Ugpp-1* (Uridin-5'-difosfo glucosio pirofosfatasi, E.C. 2.7.7.9); *Gpi-2* (Glucosio fosfato isomerasi, E.C. 5.3.1.9); *Pgm-1*, *Pgm-2* (Fosfoglucomutasi, E.C. 5.4.2.2).

Gli alleli sono stati indicati nel modo seguente: l'indice 100 è stato attribuito all'allele più comune nel campione di *P. vulgaris* dei Monti Lucretili (Lazio); indici maggiori (o minori) sono stati dati agli altri alleli, a seconda della loro mobilità elettroforetica rispetto all'allele 100.

La Tab. 29 mostra a) gli alleli presenti in tre taxa della sezione *Cuneifolia* e b) i fenotipi elettroforetici e gli alleli osservati nelle popolazioni di *P. palinuri* studiate. Questa specie mostra ai sette loci analizzati un elevato numero di alleli: 25 e la coesistenza di alleli *Cuneifolia* e non-*Cuneifolia* nel rapporto di circa 1:1. Questi due fatti forniscono la prova della struttura ibrida di *P. palinuri*. Questa specie si è verosimilmente originata col processo seguente: a) l'incrocio di un ancestor diploide *Cuneifolia*-like (specie materna) con una specie di primule, pure diploidi ma appartenente ad una sezione diversa (probabilmente *Chrystallophlomis*); dopo tale ibridazione si è realizzato b) un raddoppiamento del numero cromosomico (*chromosome doubling*), che ha ripristinato la riproduzione sessuale; è seguito c)

Tab. 29. Alleli e fenotipi elettroforetici osservati in taxa diploidi ($2n = 22$) della sezione *Cuneifolia* (A) e nell'esaploide *Primula palinuri* ($6x = 66$) della sezione *Auricula* (B). Gli alleli di *Cuneifolia* osservati in *P. palinuri* sono indicati in grassetto. Per ogni specie o taxon considerato gli alleli e i fenotipi vengono dati a ciascun locus in ordine di frequenza decrescente.

Sezione *Cuneifolia* (A)

P. cuneifolia cuneifolia

<i>Mdh-2</i>	93
<i>6Pgdh-2</i>	94
<i>NADHdh-2</i>	99
<i>Ugpp-1</i>	110, 114

<i>Gpi-2</i>	97, 90
--------------	--------

<i>Pgm-1</i>	83, 78
--------------	--------

<i>Pgm-2</i>	78, 82, 72
--------------	------------

P. cuneifolia heterodonta

<i>Mdh-2</i>	93
<i>6Pgdh-2</i>	94
<i>NADHdh-2</i>	99
<i>Ugpp-1</i>	114
<i>Gpi-2</i>	90, 97
<i>Pgm-1</i>	72
<i>Pgm-2</i>	78, 72, 82

P. nipponica

<i>Mdh-2</i>	93
<i>6Pgdh-2</i>	94
<i>NADHdh-2</i>	94
<i>Ugpp-1</i>	114, 110
<i>Gpi-2</i>	97
<i>Pgm-1</i>	83, 87, 78
<i>Pgm-2</i>	72

Sezione *Auricula* (B)

P. palinuri, fenotipi elettroforetici

<i>Mdh-2</i>	93 , 93/102
<i>6Pgdh-2</i>	94 /103, 94 /101/103, 94 /101
<i>NADHdh-2</i>	99 /109, 99 /104/109, 94 / 99 /109
<i>Ugpp-1</i>	99/106/ 114 , 92/106/ 114 , 92/99/106/ 114 , 99/106, 99/106/116, 99/116
<i>Gpi-2</i>	90 /106, 90 /97/106, 90 /102/106, 90 /97/102/106, 97 /102/106, 90 /102, 90 /97/102
<i>Pgm-1</i>	78/87, 78/87/91, 78/91, 72/91, 78/87/98
<i>Pgm-2</i>	72, 67/72

P. palinuri, alleli

<i>Mdh-2</i>	93 , 102
<i>6Pgdh-2</i>	94 , 101, 103
<i>NADHdh-2</i>	99 , 94 , 109, 104
<i>Ugpp-1</i>	99, 106, 114 , 92, 116
<i>Gpi-2</i>	90 , 106, 102, 97
<i>Pgm-1</i>	78, 87, 91, 72, 98
<i>Pgm-2</i>	72, 67

l'incrocio con una terza specie, probabilmente *Crystallophlomis*-like (o il reincrocio con la specie parentale paterna); infine, d) c'è stato un nuovo chromosome doubling, che ha completato l'evoluzione del cariotipo alloesaploide di *P. palinuri*.

Lo studio della struttura genetica della sezione *Cuneifolia* condotto analizzando più popolazioni delle due sole specie attualmente esistenti: *P. cuneifolia* (inclusa la sottospecie nominale della Siberia e la sottospecie giapponese *heterodonta*) e *P. nipponica* (endemica dell'isola giapponese di Honshu), ha verosimilmente permesso di individuare la quasi totalità degli alleli di tale sezione. Mentre gli alleli *non-Cuneifolia* osservati nel specie poliploidi del genere *Dodecatheon* e del genere *Primula*, sottogenere *Auriculastrum* (incluso *P. palinuri*) sono pressoché tutti tali, cioè assenti nella sezione *Cuneifolia*, gli alleli *Cuneifolia* sono in parte alleli privati di questa sezione, ma in parte sono condivisi dalle specie parentali paterne dei poliploidi sopra ricordati. L'ipotesi che non vi sia condivisione di alleli tra le specie parentali materne e paterne dei poliploidi (incluso *P. palinuri*) può essere esclusa; tale ipotesi equivarrebbe a supporre l'esistenza di una distanza genetica (D) infinita (o, ciò che è equivalente, di un'identità genetica $I = 0$) tra tali parentali, ma ciò è escluso dai dati genetici disponibili.

Tale fenomeno è bene illustrato da *P. palinuri*; in questa specie alloesaploide quasi la metà degli alleli osservati provengono dalla specie materna d'origine *Cuneifolia*-like (11 su 25), mentre gli altri (14 su 25) sono alleli *non-Cuneifolia* di origine paterna. Si tratta verosimilmente di alleli della sezione *Crystallophlomis*; le specie paterne degli alloploidi del genere *Dodecatheon* e del genere *Primula*, sottogenere *Auriculastrum*, sembrano, infatti, appartenere a tale sezione.

Degli undici alleli *Cuneifolia* di *P. palinuri* una parte, come abbiamo visto, è esclusiva di questa sezione, mentre un'altra è condivisa.

Nell'ipotizzare il rapporto numerico tra alleli di *P. palinuri* che derivano da taxa materni diploidi *Cuneifolia*-like ed alleli *non-Cuneifolia*, provenienti dalla (o dalle) specie diploidi di origine paterna, risulta necessario procedere a una stima, per quanto approssimativa e preliminare, degli alleli *Cuneifolia* condivisi, presenti cioè anche nella (o nelle) specie paterne di origine di *P. palinuri*.

Nei taxa che appaiono finora i migliori candidati per tale ruolo, individuati nella sezione *Chrystallophlomis*, il numero di alleli *Cuneifolia* condivisi varia tra 1 e 4. Sulla base di tale stima il rapporto numerico 11 alleli *Cuneifolia*: 14 alleli *non-Cuneifolia*, osservato in *P. palinuri* (che equivale, rispettivamente, a 44 e a 56 %), potrebbe diventare da 40 a 28 % alleli *Cuneifolia*. Si passerebbe, quindi, da quasi la metà a meno di un terzo di alleli privati *Cuneifolia* presenti in questa specie (gli alleli *Cuneifolia* condivisi non debbono evidentemente influenzare il rapporto numerico tra alleli privati *Cuneifolia* e alleli *non-Cuneifolia*).

Tornando alle ipotesi sopra formulate sull'origine di *P. palinuri*, nel caso di un ibrido tetraploide derivato da due specie parentali, rispettivamente *Cuneifolia*-like (la parentale materna) e *Chrystallophlomis*-like (la paterna), che reincrociasse con la specie parentale paterna, la percentuale degli alleli *Cuneifolia* sarebbe del 33%, un valore del tutto simile a 32%, che si avrebbe ipotizzando che il reincrocio con la specie parentale paterna si realizzasse con un taxon che avesse 3 alleli di tipo *Cuneifolia* condivisi.

Un'ipotesi alternativa sull'origine di *P. palinuri* (e di altre specie affini della sezione *Auricula*) ipotizza l'incrocio di un taxon allotetraploide tipo *Dodecatheon pulchellum* (originatosi come nell'ipotesi precedente dall'incrocio di una specie materna diploide *Cuneifolia*-like per una paterna, anch'essa diploide, *Chrystallophlomis*-like, seguito dal raddoppiamento cromosomico), che reincrociasse con un taxon parentale paterno diploide *Chrystallophlomis*-like. Anche dopo tale incrocio si avrebbe un raddoppiamento cromosomico, che ripristinerebbe la riproduzione sessuale e renderebbe la specie ibrida alloesaploide come *P. palinuri*.

Caratteristiche evolutive della speciazione per ibridazione

La speciazione per ibridazione ha caratteristiche evolutive particolari:

- l'evoluzione e la comparsa di vari adattamenti è relativamente rapida;
- hanno grande importanza la ricombinazione omeologa e i riordinamenti cromosomici;
- i tassi di evoluzione dei geni regolatori sono più elevati (Barrier *et al.*, 2001);

- il ruolo evolutivo delle mutazioni è minore (l'origine ibrida fa sì che il polimorfismo sia particolarmente elevato);
- sono molto importanti sia la perdita o il silenziamento dei geni, sia la loro espressione;
- si verifica concerted evolution dei repeats del DNA ribosomiale;
- si hanno cambiamenti nella metilazione del DNA;
- il funzionamento e/o l'espressione di geni è spesso differente in organi o stadi di vita diversi (compartimentazione, subfunzionalizzazione).

Come si vede, nelle specie allopoliploidi i cambiamenti genetici, epigenetici e genomici non sono qualitativamente diversi da quelli delle altre specie, ma hanno peculiari intensità, modalità e frequenza.

Origine geografica e temporale della sezione *Auricula*

E' molto probabile che le specie progenitrici diploidi della sezione *Auricula*, il taxon parentale materno *Cuneifolia*-like e quello paterno *Chrystallophlomis*-like, abbiano ibridato nella Siberia nord-orientale durante una delle ultime glaciazioni, forse l'ultima, dando origine all'antenato alloesaploide di tale sezione. In tale regione è attualmente ancora presente *P. cuneifolia cuneifolia*, discendente attuale della specie parentale materna di tutti gli *Auriculastrum* e *Dodecatheon* poliploidi. Dalla Siberia nord-orientale esso ha raggiunto la catena alpina, ove è avvenuto il differenziamento evolutivo e la radiazione che ha dato origine alle specie attuali della sezione *Auricula*. La maggior parte di tali specie, più di venti sulle quasi trenta finora descritte, è presente ancora oggi nella catena alpina.

Gli antenati ibridi e poliploidi di *Primula* e *Dodecatheon* avrebbero rapidamente fatto estinguere per competizione i taxa diploidi di origine. Non esistono, attualmente, tranne una limitatissima eccezione, aree di sympatria tra i taxa diploidi di *Cuneifolia* e *Chrystallophlomis* e le specie allopoliploidi da esse derivate.

I dati allozimici sono a favore dell'origine recente della sezione *Auricula* (incluso *P. palinuri*) databile come si è detto all'ultima o a una delle ultime glaciazioni. Tali dati consentono di escludere l'ipotesi di un'origine remota della

sezione *Auricula*, come ipotizzato da Chiarugi e da vari altri autori. Recentemente Zang *et al.*, (2002) hanno ripreso tale ipotesi datando l'origine della sezione *Auricula* a 3 milioni di anni fa, e quella delle sue sottosezioni *Euauricula* e *Cyanopsis* a più di 2 milioni di anni fa. Tali stime sono state ottenute da questi autori sulla base di misure di divergenza genetica, calcolate con gli ITS e calibrate su reperti fossili. Le relazioni filogenetiche dirette tra *Soldanella* e i progenitori della sezione *Auricula*, ipotizzate da questi autori non sembrano adeguatamente documentate. In ogni caso tali stime sono del tutto incompatibili non solo con quelle ricavate dai dati allozimici, ma anche da quelle basate sul differenziamento di varie sequenze del cpDNA (Mast *et al.*, 2004). Va ricordato che è sempre necessaria molta cautela nella calibrazione dei tempi di divergenza evolutiva a partire da quelli di distanza genetica, come mostrano le radicali discrepanze nei dati relativi al medesimo gruppo, animale o vegetale, pubblicati recentemente da vari autori, che hanno utilizzato differenti marcatori molecolari.

Struttura genetica e variabilità di *Primula palinuri*

Lo studio genetico su base allozimica di popolazioni di *P. palinuri* di dimensioni diverse, anche molto piccole (pochi individui), non ha mostrato gli evidenti fenomeni di erosione della variabilità genetica che si osservano nelle piccole popolazioni della gran parte delle specie animali e vegetali. Ciò è dovuto all'origine ibrida e alla struttura alloploide di questa specie e delle altre della sezione *Auricula*. In particolare, le piccole popolazioni di *P. palinuri* non presentano una sensibile riduzione della variabilità genetica a causa di fenomeni di inbreeding e di deriva. L'unica causa accertata di perdita di variabilità genetica (e di alleli) in tali popolazioni risulta legata alla ricombinazione, in particolare a quella omeologa. E' stata, d'altra parte, documentata la fissazione di nuovi alleli originati per mutazione, che differenziano popolazioni di *P. palinuri* geograficamente anche prossime.

Il flusso genico tra le popolazioni di questa specie della Campania meridionale e della Calabria settentrionale risulta completamente interrotto. Del resto

la relittazione di popolazioni di *P. palinuri* è un fenomeno attualmente in atto, ed è dovuto sia a riduzione dell'habitat naturale, sia all'estinzione di popolazioni.

Le popolazioni di questa specie, oltre a mostrare un'elevata diversità genetica, risultano tra loro sensibilmente differenziate. Ciò vale soprattutto per quelle della parte nord (Campania meridionale) e della parte sud (Calabria settentrionale) dell'areale, che costituiscono unità evolutive differenti.

Conservazione di *Primula palinuri*

P. palinuri, come si è visto, è specie a forte e imminente rischio di estinzione. La situazione è drammaticamente peggiorata nel corso degli ultimi decenni, mentre non è stata osservata almeno finora alcuna tendenza di segno opposto.

Questa specie, pure essendo straordinariamente euriecia e tollerante alle più diverse condizioni ambientali (climatiche, di substrato, ecc.), ha scarsissime capacità competitive, come documentato da esperimenti tuttora in atto.

P. palinuri colonizza solo aree in cui le specie competitori non possano sopravvivere a lungo. L'estensione di tali aree è andata in questi ultimi anni drasticamente riducendosi, anche per la diffusione di specie vegetali un tempo assenti, o alloctone.

La causa principale della relittazione, della riduzione delle dimensioni e dell'estinzione di popolazioni di *P. palinuri* è l'impatto antropico, particolarmente quello del turismo, cresciuto esponenzialmente in questi anni. Una misura di tutela necessaria ma non sufficiente alla conservazione di *P. palinuri* sarebbe rappresentata dall'ampliamento del parco Nazionale del Cilento e del Vallo di Diano. Attualmente le poche popolazioni numerose e relativamente integre di questa specie si trovano al di fuori del Parco, in Basilicata e in Calabria, in particolare nell'isola di Dino. Le popolazioni presenti nel Parco hanno subito negli ultimi decenni una vera falcidia. Per esempio, quella del *locus classicus* sulla spiaggia prospiciente il porto di Capo Palinuro è in gravissimo e rapido declino; ciò è dipeso principalmente dall'ampliamento della strada di accesso al porto, dall'aumentato traffico veicolare e dalla costruzione di numerosissimi edifici sulla spiaggia e a ridosso della grande arete

rocciosa, che era colonizzata da una popolazione di *P. palinuri* straordinariamente numerosa.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi fornisce dati utili per eventuali azioni di conservazione oltre a dati che hanno consentito una comprensione dei processi evolutivi e dei meccanismi di speciazione delle specie studiate. Queste comprendono taxa italiani del genere *Santolina*, la pianta acquatica *Hottonia palustris* e l'endemica *Primula palinuri*. Sono tutte specie più o meno a rischio di estinzione per le quali sono stati messi a punto protocolli di germinazione dei semi e delle quali è stata studiata la struttura e la diversità genetica. La conoscenza della struttura genetica delle popolazioni consente di stimare la diversità genetica, di individuare eventuali fenomeni di erosione genetica e popolazioni con elevato polimorfismo. Ciò consente, insieme a dati demografici, di identificare le popolazioni in declino e quelle da cui si può prelevare diversità per il ripristino delle precedenti. Dalle popolazioni geneticamente più variabili dovrebbero essere prelevati semi per la conservazione *ex situ* della diversità della specie. Le strutture dedicate a tale scopo sono le banche del germoplasma come quella dell'Università della Tuscia. Qui, oltre allo stoccaggio del germoplasma (semi, spore, ecc.), vengono messi a punto protocolli di germinazione per saggiarne la vitalità in modo da mantenere intatte le riserve di diversità. Ciò consentirà nel futuro anche il ripristino della variabilità genetica in popolazioni erose e il reinsediamento di popolazioni laddove vi è stata estinzione locale. Proprio nell'ambito della presente tesi per i taxa in esame è stato possibile raccogliere germoplasma dalle diverse popolazioni, e avviarne la conservazione a medio-lungo termine.

Pur avendo studiato tre gruppi di specie molto diversi sono emersi alcuni elementi in comune, in particolare: (a) la riduzione dell'habitat dovuta all'impatto antropico che ne ha ridotto le dimensioni delle popolazioni; (b) la bassa capacità di competere con altre specie vegetali; (c) la facilità ad ottenere nuovi individui e a completarne lo sviluppo, a partire da seme, senza l'impiego di tecniche e strutture specializzate.

In *Santolina* l'analisi della struttura genetica ha consentito di riconoscere la stretta affinità di tre taxa diploidi italiani: *S. ligustica*, *S. etrusca*, *S. neapolitana*, per i quali si propone lo status di sottospecie, anche considerato lo scarso differenziamento morfologico. La specie, per motivi di priorità, è *S. neapolitana sensu lato* e verosimilmente fino a qualche secolo fa occupava le coste tirreniche dalla Liguria alla Campania. L'endemismo delle Alpi Apuane, *S. pinnata*, risulta affine a quest'ultima ma ben differenziata geneticamente.

La caratterizzazione genetica della santolina coltivata, la pentaploide *S. marchii*, ci consente di confermare l'origine ibrida, ma tra specie piuttosto affini tra loro appartenenti al gruppo *S. chamaecyparissus* (ad esempio un incrocio *S. benthamiana* x *S. etrusca* potrebbe essere all'origine di *S. marchii*). *S. insularis*, endemismo esaploide della Sardegna centro-meridionale, risulta anch'essa di origine ibrida, ma a differenza di *S. marchii*, le specie parentali sono maggiormente differenziate. Saranno necessari ulteriori studi per identificarle.

Primula palinuri è un alloesaploide, come tutte le specie della sezione *Auricula* a cui appartiene. Il progenitore delle auricole si è verosimilmente originato in Siberia nord-orientale da un incrocio tra una specie materna diploide *Cuneifolia*-like con una specie paterna diploide *Crystallophlois*-like seguito da un probabile reincrocio e raddoppiamento cromosomico. In Siberia nord-orientale oggi si trova uno dei discendenti della specie materna *P. cuneifolia*, specie diploide. I dati genetici suggeriscono un'origine recente del progenitore di *P. palinuri*, databile all'ultima o a una delle ultime glaciazioni. Questo ha poi colonizzato le Alpi dove si è differenziato ed è andato incontro ad una radiazione adattativa.

BIBLIOGRAFIA

- Amadei L., Giordani A., Tomei P.E., 1982, Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 882-888. Inform. Bot. Ital. 14: 243 – 247.
- Anderberg A.A., Ståhl B., Källersjö M., 1998 Phylogenetic relationships in the Primulales inferred from rbcL sequence data. Plant Syst Evol 211: 93–102.
- Anderberg A.A., B. Stahl B., 1995. Phylogenetic interrelationships in the order Primulales, with special emphasis on the family circumscriptions. Canad. J. Bot. 73: 1699-1730.
- Anderberg A.A., Rydin C., Kallersjo M., 2002. Phylogenetic relationship in the order Ericales s.l.: analyses of molecular data from five genes from the plastid and mitochondrial genomes. Amer. J. Bot. 89: 677-687.
- Anderberg A.A., Ståhl B., 1995. Phylogenetic interrelationships in the order Primulales, with special emphasis on the family circumscriptions. Can. J. Bot. 73: 1699–1730.
- Anderberg A.A., Ståhl B., Källersjö M., 2000. Maesaceae, a new primuloid family in the order Ericales s.l. Taxon 49: 183–187.
- Anderberg A.A., Stahl B., M. Kallersjo M., 1998. Phylogenetic relationships in the Primulales inferred from rbcL sequence data. Plant Syst. Evol. 211: 93-102.
- Angiolini C., 2001. Il pattern di distribuzione di *Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato. Inform. Bot. Ital. 33: 351-357.
- Angiolini C., Boscagli A., 1997. Relation between some environmental parameters and *Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato occurrence in the stream beds of central Italy. Lagasalia 19: 719-724.
- Angiolini C., Boscagli A., Foggi B., Scoppola A., 1996. Studio preliminare su distribuzione ed ecologia di *Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato. Coll. Phytosoc. 24: 626-633.

- Angiolini C., Landi M., Boddi M., Frignani F., 2005. La vegetazione dell'alveo fluviale del sito d'importanza regionale torrente Trasubbie (Grosseto, Toscana meridionale). *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B* 112: 127-151.
- Ansaldi M., Guazzi E., Puccini R., 2009. L'Orto Botanico "Pietro Pellegrini". Un giardino alpino nel Parco Regionale delle Alpi Apuane. Massa.
- Antrobus S., Lack A.J., 1993. Genetics of colonizing and established populations of *Primula veris*. *Heredity*, 71: 252-258.
- Arata M., 1938. Contributo allo studio della Flora del Cilento (Salernitano). *Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s.* 45: 188-211.
- Arcangeli G., 1894. *Compendio della flora italiana*, ed. 2. Ermanno Loescher, Torino.
- Arduino P., Cianchi R., Rossi W., Corrias B., Bullini L., 1995. Genetic variation in *Orchis papilionacea* (Orchidaceae) from Central Mediterranean region: taxonomic inferences at the intraspecific level. *Pl. Syst. Evol.* 194: 9-23.
- Arduino P., Verra F., Cianchi R., Rossi W., Corrias B., Bullini L., 1996. Genetic variation and natural hybridization between *Orchis laxiflora* and *Orchis palustris* (Orchidaceae). *Pl. Syst. Evol.* 202: 87-109.
- Arrigoni P.V., 1977. Santoline italiche nuove. *Webbia* 32: 129-134.
- Arrigoni P.V., 1979. Le genre *Santolina* L. en Italie. *Webbia* 34: 257-264.
- Arrigoni P.V., 1982a. *Santolina* L. In: Pignatti S., *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna, pp. 64-65.
- Arrigoni P.V., 1982b. *Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi et D'Amato. In: Pedrotti F. (ed.), *Guide-Itinéraire de l'Excursion Internationale de Phytosociologie en Italie centrale (2-11 juillet 1982)*: 494. Centro stampa, Università degli Studi di Camerino. Camerino.
- Arrigoni P.V., 1982c. Le piante endemiche della Sardegna: 98-105. 98 - *Bryonia marmorata* Petit. 99 - *Santolina insularis* (Genn. ex Fiori) Arrigoni. 100 - *Santolina corsica* Jord. et Fourr. 101 - *Festuca morisiana* Parl. 102 - *Festuca sardoa* (Hackel in Barbey) Richter. 103 - *Poa balbisii* Parl. 104

- *Trisetum gracile* (Moris) Boiss. 105 - *Helianthemum allionii* Tineo. Boll. Soc. Sarda Sci. Nat. 21 (1981): 333-372.
- Arrigoni P.V., Mori B., 1980. Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 722-727. Inform. Bot. Ital. 12: 148.
- Baart I., Haidvogel G., Hohensinner S., Janauer G., Preiner S., Hein T., 2006. Macrophytes and aquatic neophytes in the floodplain Lobau during the last 160 years: temporal distribution. In: Proceedings 36th International Conference of IAD. Austrian Committee DanubeResearch/IAD, Vienna, pp. 70-75.
- Babji V., Trpin D., Vres B., 1999. Approaches to mapping the flora of Slovenia and the connection with mapping the flora of Europe. Acta Bot. Fennica 162: 79-84.
- Bacchetta G., Bueno Sánchez A., Fenu G., Jiménez-Alfaro B., Mattana E., Piotta B., Virevaire M. (eds.) 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias, La Caixa.
- Bacchetta G., Fenu G., Mattana E., Piotta B., Virevaire M. (eds.) 2006. Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma. APAT - Manuali e linee guida 37/2006.
- Ballero M., Bruni A., Sacchetti G., Poli F., 1995. Indagine etnofarmacobotanica del territorio di Arzann (Sardegna orientale). Ann. Bot. (Roma) 52: 489-500.
- Ballero M., Fresu I., 1991. Piante officinali impiegate in fitoterapia nel territorio del Marganai (Sardegna sud-occidentale). Fitoterapia 62: 524-531.
- Barbero M., Bono G., 1973. La végétation orophile des Alpes Apuanes. Vegetatio 27: 1-48.
- Barrier M., Robichaux R.H., Purugganan M.D., 2001 Accelerated regulatory gene evolution in an adaptive radiation. PNAS 98: 10208-10213.
- Baskin C.C., Baskin J.M., Chester E.W., 1996. Seed germination ecology of the aquatic winter annual *Hottonia inflata*. Aquat. Bot. 54: 51-57.
- Beamish K. I., 1955. Studies in the genus *Dodecatheon* of North-western North America. Bull. Torrey Bot. Club 82: 357-366.

- Bechi N., Corsi G., Garbari F., 1996. Indagini biosistemistiche sulla flora apuana. IV. Contributo. *Webbia* 51: 31-57.
- Beguinet A., 1935. Flora e fitogeografia delle Paludi Pontine. *Archiv. Bot.* 11: 275-316.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., 1996-2001. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bennet M. D., 2004. Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411-423.
- Black W. C., 1997. BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in Genetics. Colorado State University, Ft. Collins, Co.
- Blanca G., 2009. *Santolina* L. In: Blanca G., Cabezudo B., Cueto M., Fernández López C., Morales Torres C. (eds.) *Flora Vascular de Andalucía Oriental* 4: 371-373. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Blasi C., Marignani M., Copiz R., Fipaldini M., Del Vico E. (eds.), 2010. *La Aree importanti per le Piante nelle Regioni d'Italia: il presente e il futuro della conservazione del nostro patrimonio botanico*. Progetto Artiser, Roma, p. 85.
- Boodle L.A., 1903. Comparative anatomy of the Hymenophyllaceae, Schizaceae, and Gleicheniaceae. *Annals of Botany* 17: 516.
- Borghesio L., 2004. Biodiversity erosion in the Vauda Nature Reserve (Turin, Piedmont, NW Italy). *Riv. Piem. St. Nat.* 25: 371-389.
- Boyd M., Silvertown J., Tucker C., 1990. Population ecology of heterostyle and homostyle *Primula vulgaris*: growth, survival and reproduction in field populations. *Journal of Ecology* 78: 799-813.
- Bremer K., 1972. The genus *Osmitopsis* (Compositae). *Bot. Not.* 125: 9-48.
- Bremer K., 1976. New taxa of *Osmitopsis* (Compositae). *Bot. Not.* 129: 21-24.
- Bremer K., 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3: 210-253.

- Bremer K., Humphries C., 1993. Generic monograph of the Asteraceae-Anthemideae. Bull. Nat. Hist. Mus. 23: 71-177.
- Bremer K., Källersjö M., 1985. Taxonomic notes on *Hymenolepis* (Asteraceae-Anthemideae). Nord J. Bot. 5: 27-30.
- Brewer G.J., Sing C.F., 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press, New York, London.
- Brilli Cattarini A., 1976. Genere *Santolina* L. In: Zangheri O., Flora italica: 705-706. Cedam, Padova.
- Brochmann C., Brysting A.K., Alsos I.G., Borgen L., Grundt H.H., Scheen A.-C., R. Elven E., 2004. Polyploids in arctic plants. Biological Journal of the Linnean Society 82: 521-536.
- Brock T.C.M., Mielo H., Oostermeijer G., 1989. On the life cycle and germination of *Hottonia palustris* L. in the wetland forest. Aquat. Bot. 35: 153-166.
- Bruhl J.J., Quinn C.J., 1990. Cypselas anatomy in the 'Cotuleae' (Asteraceae-Anthemideae). Bot. J. Linn. Soc. 102: 37-59.
- Brullo S., Marcenò C., 1979. *Dianthion rupicolae* nouvelle alliance Sud-Tyrienne des *Asplenietalia glandulosi*. Doc. Phytosoc. 4: 131-146.
- Brys R., Jacquemyn H., Hermy M., 2007. Impact of mate availability, population size, and spatial aggregation of morphs on sexual reproduction in a distylous, aquatic plant. American Journal of Botany 94: 119-127.
- Bugliazzini M.A., 1999/2000. Variabilità e diversità genetica della felce *Osmunda regalis* (Pteridophyta, Osmundaceae) in Italia: contributo alle conoscenze di base necessarie per un corretto programma di conservazione di una specie rarefatta. Tesi di Laurea, Università degli Studi della Tuscia.
- Bullini L., Arduino P., Cianchi R., 1989. L'elettroforesi multilocus nello studio della variabilità e della divergenza genetica nelle piante. Atti Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem., Serie B 96: 267-305.
- Bullini L., Cianchi R., Arduino P., De Bonis L., Mosco M.C., Verardi A., Porretta D., Corrias B., Rossi W., 2001. Molecular evidence for allopolyploid

- speciation and a single origin of the western Mediterranean orchid *Dactylorhiza insularis* (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 193-201.
- Bullini L., Sbordoni V., 1980. Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference. *Boll. Zol.* 47 (suppl.): 95-112.
- Buscalioni L., Muscatello E., 1912-1914. Endemismi ed esodemismi della Flora Italiana. *Malpighia*, 24: 465; 25: 85, 157, 283, 453; 26: 65, 145, 345.
- Cahalan C.M., Gliddon C., 1985. Genetic neighbourhood sizes in *Primula vulgaris*. *Heredity* 54: 65-70.
- Caneva G., Cutini M., Savo V., Zivkovic L., Salerno G., 2003. Peculiarità floristiche e valore naturalistico di un biotopo di particolare interesse biogeografico: il Fiordo di Furore (M.ti Lattari, Italia meridionale). 98° Congresso della Società Botanica Italiana, Catania 24 -26 settembre 2003, Conservazione della natura, C2.
- Caputo G., La Valva V., Nazzaro V., Ricciardi M., 1989-1990. La flora della Penisola Sorrentina (Campania). *Delpinoa*, n.s. 31-32: 3-97.
- Carlquist S., 1976. Wood anatomy of the Compositae: a summary with comments on factors controlling wood evolution. *Aliso* 6: 25-44.
- Carson H.L., 1959. Genetic conditions that promote or retard the formation of species. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 24: 87-103.
- Caruel T., 1860-1864. *Prodromo della Flora Toscana*. 1-4. Firenze.
- Chambers K.L., Green D., Potampa S., Mc Mahan L., 1998. IOPB chromosome data 13. *Newslett. Int. Organ. Pl. Biosyst. (Oslo)*. 29: 18-22.
- Chase M.W., Soltis D.E., Olmstead R.G., Morgan D., Les D.H., Mishler B.D., Duvall M.R., *et al.*, 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 80: 528-580.

- Cheliak W.M., Pitel J.A., 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42, Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Canada.
- Chiarugi A., 1941. Sul numero dei cromosomi della *Primula palinuri* Petagna. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s. 47: 519-520.
- Chiarugi A., 1952. La *Primula palinuri* Petagna, il celebre endemismo della costa tirrenica della Lucania. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s. 59: 465-466.
- Chiarugi A., 1955/56. *Primula palinuri* Petagna, posizione sistematica e significato fitogeografico attraverso l'indagine citogenetica. Webbia 11: 861-888.
- Clusius C., 1601. Rariorum plantarum historia: 341-342. Antuerplae.
- Colonna F. (1a ed. Napoli, 1592; 2a ed. Firenze, 1744): Phytobasanos.
- Comai L., 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. Plant Mol. Biol. 43: 387-399.
- Comai L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature Reviews Genetics 6: 836-846.
- Côme D., 1970. Les obstacles à la germination. Masson & CIE, Paris.
- Comes H.P., J. W. Kadereit J.W., 2003. Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System. Taxon 52: 451-462.
- Conti E., Suring E., Boyd D., Jorgensen J., Grant J., Kelso S., 2000. Phylogenetic relationships and character evolution in *Primula* L.: the usefulness of ITS sequence data. Plant Biosystems 134: 385-392.
- Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C. (eds.) 2005. An annotated check-list of the Italian vascular flora. Palombi Editori, Roma.
- Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1992. Libro Rosso delle Piante d'Italia. WWF Italia, Roma.
- Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. WWF Italia. Società Botanica Italiana. Università di Camerino, Camerino.

- Coolbear P., Grierson D., Heydecker W., 1980. Osmotic pre-sowing treatments and nucleic acid accumulation in tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*). Seed Sci. Technol. 8: 289-303.
- Corsi G., Gaspari G., Pagni A.M., 1980. L'uso delle piante nell'economia domestica della Versilia collinare e montana. Atti Soc. Toscana Sci. Nat. Mem. Ser. B 87: 309-386.
- Coste H., 1903. Flore descriptive et illustrée de la France. 2: 249. P. Klincksieck, Paris.
- Cronquist A., 1955. Phylogeny and taxonomy of the Compositae. Amer. Midl. Naturalist 53: 478-511.
- Cronquist A., 1977. The Compositae revisited. Brittonia 29: 137-153.
- Cronquist A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cronquist A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Gardens, New York.
- Cruzan M. B., 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae), Evolution, 55(8): 1569-1580.
- Curtis W., 1792. *Primula marginata*, Silver-Edged Primula, Bot. Mag. 6: 191.
- Da Cunha A.B., Dobzhansky T., 1954. A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. Evolution 8: 119-134.
- Dahlgren R., 1980. A revised system of classification of the angiosperm. J. Linn. Soc., Bot. 80: 91-124.
- Darwin C., 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London.
- Dawe J.C., Murray D.F., 1979. In IOPB Chromosome Number Reports LXIII. Taxon, 28 (1, 2/3): 265-279.
- Dawe J.C., Murray D.F., 1981. In Chromosome Number Reports LXXIII. Taxon, 30 (4): 829-861.

- De Candolle A.P., 1815. *Santolina*. In : J.B. Lamarck et A.P. De Candolle, Flore Française, ediz. 3, 4: 200. Destray Libr., Paris.
- De Candolle A.P., 1837. Prodrômus systematis naturalis regni vegetabilis. 6: 35. Paris.
- De Logu A., Loy G., Pellerano M.L., Bonsignore L., Schivo M.L., 2000. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. Antiviral Research 48: 177-185.
- Del Prete C., Balderi F., Garbari F., 1990. Geobotanical research on Mount Pisano (Tuscany, Italy), VIII. A preliminary checklist of the vascular flora. Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B 97: 121-192.
- Duby J.E., 1828. Aug. Pyrami de Candolle Botanicon Gallicum, ed. 2, vol. 1. Mme Ve Bouchard-Huzard, Paris.
- Dvorák F., 1989. Chromosome counts and chromosome morphology of some selected species. Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purkyn. Brun. 19: 301–322.
- Ehrlich P.R., P. H. Raven P.H., 1969. Differentiation of populations. Science, 165: 1228-1232.
- Ehrlich P.R., Wilson E.O., 1991. Science 253: 758–762.
- Eldredge N., 2005. The Sixth Extinction. American Institute of Biological Sciences.
<http://www.actionbioscience.org/newfrontiers/eldredge2.html>
- Endels P., Jacquemyn H., Brys R., Hermy M., De Blust G., 2002. Temporal changes (1986-1999) in populations of primrose (*Primula vulgaris* Huds.) in an agricultural landscape and implications for conservations. Biological Conservation 105: 11-25.
- Endler J.A., 1977. Geographic Variation, Speciation and Clines. Princeton Univ. Press, New York.
- Fedorov A.A., 1952. *Primula*. In: Shishkin B. K. & Bobrov E. G. (eds.), Flora SSSR. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva. Tradotta in inglese: Flora of the U.S.S.R. (1986). Bishen Singh Mahhendra Pal Singh & Koeltz Scientific Books.

- Feijóo M.C., Iglesias I., Rodríguez-Oubiña J., 2000. Contribution to the conservation studies of *Leucanthemum gallaecicum* Rodr.-Oubiña & S. Ortiz. *Portugaliae Acta Biologica* 19: 113-119.
- Felsenstein J., 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distribuito dall'autore. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fenderson G.K., 1986. A Synoptic Guide to the Genus *Primula*. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Ferguson L.F., 1993. *Hottonia* L. In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Weeb D.A. (eds.), *Flora Europaea*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 3: 24.
- Fernald M.L., 1950. *Gray's Manual of Botany*. 8th edn., American Book Company, New York.
- Ferrarini E., 1967. Studi sulla vegetazione di altitudine delle Alpi Apuane (Continuazione). *Webbia* 22: 295 – 404 .
- Fiori A., 1908. Prodrómo di una geografia botanica d'Italia (in Fiori A., Paoletti G.: *Flora Analitica d'Italia*, Padova, 1896-1908).
- Fisher R.A., 1954. *Statistical Methods for Research Workers*. 12th ed. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Flamini G., Caroti Ghelli G., Pistelli L., Morelli I., 1994. Compounds from *Santolina pinnata*. *Planta Med.* 60: 97
- Ford E.B., 1971. *Ecological Genetics*, 3rd ed. Chapman and Hall Ltd, London.
- Francisco-Ortega J., Barber J.C., Santos-Guerra A., Febles-Hernandez R., Jansen R.K., 2001. Origin and evolution of the endemic genera of *Gonosperminae* (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 88: 161-169.
- Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Hines A., Jansen R.K., 1997. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1595-1613.

- Fujii N., Ueda K., Watano Y., Shimizu T., 1995. Intraspecific sequence variation in chloroplast DNA of *Primula cuneifolia* Ledeb. J. Phytogeogr., Taxon 43: 15-24.
- Fujii N., Ueda K., Watano Y., Shimizu T., 1999. Further analysis of intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae): implications for Biogeography of the Japanese alpine flora. J. Plant Res. 112: 87-95.
- Gadek P.A., Bruhl J.J., Quinn C.J., 1989. Exine structure in the 'Cotuleae' (Anthemideae, Asteraceae). Grana 28: 163-178.
- Garbari F., 1974. Cariologia, citogeografia, corologia della flora italiana e suoi aspetti tassonomici. Lavori Soc. Ital. Biogeogr., n. s. 4: 111-123.
- Garbari F., Bechi N., 1992. Tipificazione di specie apuane di Antonio Bertoloni. Memorie dell'Accademia Lunigianese di Scienze. Classe di Scienze Naturali, Fisiche e Matematiche 60-61: 161-176.
- Garbari F., Borzatti Von Loewenstern A., 2005. Flora pisana: elenco annotato delle piante vascolari della provincia di Pisa. Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B 112: 1-125.
- Gelmi E., 1894. Le Primule Italiane. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 1: 270-282.
- GENMEDOC, 2004-2006. Prácticas de germinación en los bancos de semillas de la red GENMEDOC.
- Gleason H.A., Cronquist A., 1991. Manual of vascular plants of Northeastern United States and adjacent Canada. The New York Botanical Garden, Bronx, NY.
- Glover B.J., Abbott R.J., 1995. Low genetic diversity in the Scottish endemic *Primula scotica* Hook. New Phytologist 129: 147-153.
- Goldman D.H., Jansen R.K., Van der Berg C., Leitch I.J., Fay M.F., Chase M.W., 2004. Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy and possible hybrid speciation. Am. J. Bot. 91: 707-723.

- Goodwin J.D., 1975. Spontaneous hybrids in *Dodecatheon* (Primulaceae). *Madroño* 23: 81-87.
- Gray A., 1886. Essay toward a revision of *Dodecatheon*, 11: 231-234.
- Grenier M., Godron M., 1850. Flore de France. 2: 160-161. Paris.
- Greuter W., 2008. *Santolina* L. In: Greuter W., von Raab-Straube E. (eds.), Med-Checklist. A critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries. 2. Dicotyledones (Compositae). OPTIMA Secretariat, Palermo. Med-Checklist Trust of OPTIMA, Genève. Euro+Med Plantbase Secretariat, Berlin.
- Griggs R.F., 1914. Observations on the behaviour of some species at the edges of their ranges. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 41: 25-49.
- Griggs R.F., 1940. The ecology of rare plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 67: 575-594.
- Guadagno M., 1931-32. Flora Caprearum nova. *Arch. Botanico* 7: 145, 244; 8: 65, 143, 275.
- Guerrant E.O., Havens K., Maunder M., 2004. *Ex situ* conservation: supporting species survival in the wild. Island Press, Washington, D.C.
- Guinea E., Tutin T.G., 1993. *Santolina* L. In: Flora Europaea, Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Weeb D.A. (eds.), vol. 3, Cambridge University Press, Cambridge, 2nd ed., 144-145.
- Guinea F., 1970. *Santolina europaeae*. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 27: 29-43.
- Guo Y-P., Ehrendorfer F., Samuel R., 2004. Phylogeny and systematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) inferred from nrITS and plastid trnL-F sequences. *Taxon* 53: 657-672.
- Gwynne-Vaughan D.T., 1897. On polystely in the genus *Primula*. *Ann. Bot.* 11: 307-325.
- Halda J., 1988. The genus *Primula*. II subgenus *Auriculastrum* Schott. *Primroses*, 46: 135-147.

- Halda J., 1992. The genus *Primula* in cultivation and in the wild. Tethys Book, Denver, Colorado.
- Haldane J.B.S., 1930. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part IV. Isolation. Proc. Cambridge Philos. Soc. 26: 220-230.
- Hall T., Mathew B., 1997. *Dodecatheon hendersonii* Primulaceae. Curtis's Botanical Magazine 14: 137-141.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W., 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S. (Eds.), Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hamrick J.L., Linhart Y.B., Mitton J.B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 10: 173–200.
- Harris H., 1966. Enzyme polymorphisms in man. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci., 164: 298-310.
- Harris H., Hopkinson D.A., 1977: Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. Amsterdam, North-Holland.
- Haslam S.M., 1978. River plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haulten F., Fries M., 1986. Atlas of North European vascular plants. Koeltz Scientific Books, Königsten.
- Hegi G., 1927. Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Band V, 3. J.F. Lehmanns Verlag, München.
- Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L., 1977. The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press, London.
- Heywood V.H., Humphries, C.J., 1977. Anthemideae-Systematic review. In: Heywood V., Humphries C., Turner B. (eds.) The Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, New York.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A., 1991. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. Oxford University Press, New York.

- Holmgren N.H., 1994. Redefinition of *Dodecatheon dentatum* (Primulaceae) and rationale for use of varietal rank. *Brittonia* 46: 87-94.
- Holsinger K.E., 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7037-7042.
- Honsell E., 1961. La diffusione di forme esaploidi di *Primula palinuri* Petagna in diverse stazioni della costa tirrenica da Palinuro a Scalea. *Ann. di Bot.* 27: 135-144.
- Hörandl E., Jakubowsky G., Dobeš C., 2001. Isozyme and morphological diversity within apomictic and sexual taxa of the *Ranunculus auricomus* complex. *Plant Syst. Evol.* 226: 165-185.
- Hu C.M., Kelso S., 1996. Primulaceae. In: Wu Z.-Y. & Raven P. H. (eds.), *Flora of China*, 15: 39-189. Science Press and Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Hultén E., 1927-1930. *Flora of Kamtschatka and the adjacent Islands I-IV*. Kungl. Svenska Vetenskapsakademien Handlingar 3. Ser. Band 5 (1, 2), Band 8 (1, 2). Stockholm.
- Hultén E., 1948. *Flora of Alaska and Yukon*. 8. Lunds Univ. Arsskr. N.F. Avd.2.
- Hultén E., 1968. *Flora of Alaska and Neighboring Territories*. 1008 S. Stanford.
- Hultén E., 1970. *The Circumpolar Plants. II. Dicotyledons*. Kungl. Sv. Vetensk.Akad. Handl., 4. Ser., 8 (5). Stockholm.
- I.S.T.A., 1985. International rules for seed testing. *Seed Sciences and Technology*, 13: 299-355.
- Iglesias I., Feijóo M.C., Ortiz S., 2000. Contribution to the conservation studies of *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz. *Portugaliae Acta Biologica* 19: 107-112.
- Jacquemyn H., Van Rossum F., Brys R., Endels P., Hermy M., Triest L., De Blust G., 2003. Effects of agricultural land use and fragmentation on genetics, demography and population persistence of the rare *Primula vulgaris*, and implications for conservation. *Belg. J. Bot.* 136: 5-22.

- Jansen R.K., Michaels H.J., Palmer J.D., 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. *Systematic Botany* 16: 98-115.
- Jeffrey C., 1978. Corolla forms in the Compositae. Some evolutionary and taxonomic speculations. In: Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L., The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press, London.
- Johnson A.W., Packer J.G., 1968. Chromosome numbers in the flora of Ogotoruk Creek, N. W. Alaska. *Bot. Not.*, 121: 403-456.
- Jordan A., Fourreau J.P., 1869. *Icones ad Floram europae*. Paris, 2: 8-13.
- Källersjö M, G Bergqvist, AA Anderberg 2000 Generic realignment in primuloid families of the Ericales s.l.: a phylogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology *Am J Bot* 87:1325–1341.
- Källersjö M., 1985. Fruit structure and generic delimitation of *Athanasia* (Asteraceae–Anthemideae) and related South African genera. *Nord J Bot* 5:11-26.
- Källersjö M., 1988. A generic re-classification of *Pentzia* Thunb. (Compositae–Anthemideae) from southern Africa. *Bot. J. Linn. Soc.* 96: 299-322
- Källersjö M., Bergqvist G., Anderberg A.A., 2000. Generic realignment in primuloid families of the Ericales s.l.: a phylogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology. *Am. J. Bot.* 87: 1325-1341.
- Kamieński F., 1878. *Vergleichende anatomie der Primulaceen*. Naturforschende Gesellschaft.
- Kelso S. , 1991. Taxonomy and biogeography of *Primula* sect. *Cuneifolia* (Primulaceae) in North America. *Madroño* 38: 37-44.
- Kelso S., 1992. The genus *Primula* as a model for the evolution of the Alaskan flora. *Arctic. Alp. Res.* 24: 82-87.

- Kéry M., Matthies D., Spillmann H.H., 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *J. Ecol.* 88: 17-30.
- Kleiman D.G., Allen M.E., Thompson K.V., Lumpkin S., 1996. Wild mammals in captivity: principles and techniques. University of Chicago Press, Chicago.
- Klijn F., Witte J.P.M., 1999. Eco-hydrology: Groundwater flow and site factors in plant ecology. *Hydrogeology Journal* 7: 65–77.
- Kress A., 1963. Zytotaxonomische Untersuchungen an den Primeln der Sektion *Auricula* Pax. *Oesterr Bot. Z.* 110: 53-102.
- Kress A., 1989. Primulaceen-Studien, 10: Chromosomenzählungen an verschiedenen Primulaceen. Teil C., *Primula*, sectio *Auricula*. Gröbenzell/Botanical Garden Munich, Munich.
- Kurowski J.K., 2007. Procesy syndynamiczne w zbiorowiskach leśnych wywołane odwodnieniem siedlisk. *Leśne Prace Badawcze* 2: 27-44.
- La Valva V., 1992. Aspetti corologici della flora di interesse fitogeografico dell'Appennino meridionale. *Giorn. Bot. Ital.* 126: 131-144.
- La Valva V., Ricciardi M., 1976-1977. Flora e vegetazione dell'isola di Dino, Delpinoa 18-19: 127-176.
- Lacaita C., 1925. Piante italiane critiche o rare. N. *Giorn. Bot. Ital.* n.s. 32: 206-222.
- Lamarck J.B., 1778. *Flore Française*. 2 : 43. Imprimerie Royale, Paris.
- Lehmann J.G.C., 1817. *Monographia Generis Primularum*. Barth, Lipsine (Leipzig).
- Leitch I.J., Bennett M.D., 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: 470-476.
- Lesica P., Allendorf F.W., 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conserv. Biol.* 9: 753–760.
- Levene H., 1949. On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20: 91-94.
- Levin D.A., 2003. The ecological transition in speciation. *New Phytologist* 161: 91-96.

- Levin D.A., Francisco-Ortega J., Jansen R.K., 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* 10: 10-16.
- Levy M., Levin D.A., 1975. Genic heterozygosity and variation in permanent translocation heterozygotes of the *Oenothera biennis* complex. *Genetics*, 79: 493-512.
- Lewontin R.C., 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Colombia University Press, New York.
- Lim K.Y., Matyasek R., Kovarik A., Leitch A.R., 2004. Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 599-606.
- Linington S., 2001. The Millenium Seed Banck project. In : Rushton B.S., Hackney P., Tyrie C.R. (eds.), *Biological collections and biodiversity*.
- Linneo C., 1737. *Hortus cliffortianus*: 397. Amstelaedami.
- Linneo C., 1748. *Hortus upsaliensis*: 252. Amstelaedami.
- Linneo C., 1749. *Materia medica*: 134. Holmiae.
- Linneo C., 1753. *Species Plantarum*. 842. *Impensis Laurentii Salvii*, Holmiae.
- Lodi G., 1957. *Piante officinali italiane*. 2° ed., Edizioni Agricole, Bologna.
- Longo B., 1900-1902. Contribuzione alla flora calabrese. *Annuario Ist. Bot.* 9: 257-276.
- Lüdi W., 1927. *Primulaceae* (in Hegi G., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Bd. 5, Teil 3, 1715-1877).
- Marchi P., Capineri R., D'Amato G., 1979. Il cariotipo di *Santolina corsica* Jordan et Fourreau (Compositae) proveniente dai pressi di Bastia (Corsica) ed altre osservazioni. *Ann. Bot. (Roma)* 38: 1-13.
- Marchi P., D'Amato G., 1973. Numeri cromosomici per la flora Italiana: 145-150. *Inform. Bot. Ital.* 5: 93-100.
- Marconi G., 2007. *Piante minacciate di estinzione in Italia. Il "Libro Rosso" fotografico*. Gruppo Perdisa Editore/Airplane srl., Bologna.

- Mariotti Lippi M., Mori Secci M., Bechi N., Garbari F., 1999. Studies on pollen morphology in *Santolina* L. (Compositae). The Italian species. *Flora Medit.* 9: 147-162.
- Mariotti M., 1982. Flora endemica ligustica del piano basale: rapporti tra settore alpico ed appenninico. *Lav. Soc. Ital. Biogeogr.* 9: 175-209.
- Martinoli G., 1939. Contributo all'embriologia delle Asteraceae. 1-3, N. *Giorn. Bot. Ital.* n.s. 46: 259-298.
- Martins L., Oberprieler C., Hellwig F.H., 2003. A phylogenetic analysis of Primulaceae s. l. based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data. *Plant Syst. Evol.* 237: 75-85.
- Mast A.R., Feller D.M.S., Kelso S., Conti E., 2004. Buzz-pollinated *Dodecatheon* originated from within the heterostylous *Primula* subgenus *Auriculastrum* (Primulaceae): a seven-region cpDNA phylogeny and its implications for floral evolution. *Am. J. Bot.* 91: 926-942.
- Mast A.R., Kelso S., Richards A.J., Lang D.J., Feller D.M.S., Conti E., 2001. Phylogenetic relationships in *Primula* L. and related genera (Primulaceae) based on noncoding chloroplast DNA. *Int. J. Plant Sci.* 162: 1381-1400.
- Matthies D., Bräuer I., Maibom W., Tschardt T., 2004. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105: 481-488.
- Matzke M.A., Scheid O.M., Matzke A.J.M., 1999. Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *Bioessays* 21: 761-767.
- Mayr E., 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York.
- Mayr E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press/Harvard University Press, Cambridge, MA.
- McAllister H., 1987 Conservation and taxonomy of *Santolina chamaecyparissus* Agg. *Nation. Council Conserv. Pl. Gard. Newsl.* 10: 7-10.

- Melendo M., Giménez E., Cano E., Francisco Gómez-Mercado F., Valle F., 2003. The endemic flora in the south of the Iberian Peninsula: taxonomic composition, biological spectrum, pollination, reproductive mode and dispersal. *Flora* 198: 260–276.
- Miller J., Litvak M., Kelso S., 1994. Comparative reproductive biology of two alpine primrose species. *Arctic and Alpine Research* 26: 297-303.
- Minchin D., 2007. A checklist of alien and cryptogenic aquatic species in Ireland. *Aquatic Invasions* 2: 341-366.
- Moggi G., 2001. Catalogo della Flora del Cilento (Salerno). *Informatore Botanico Italiano* 33(suppl. 3): 5-116.
- Moore D.M., 1982. *Flora Europea, check-list and chromosome index*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Morden C.W., Doebley J., Schertz K.F., 1987. A manual of techniques for starch gel electrophoresis of *Sorghum* isozymes. The Texas A&M University System, College Station, Texas.
- Moreno J.C. (ed.) 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid.
- Morgan E.R., Butler R.M., Bicknell R.A., 1997. *In vitro* propagation of *Gentiana cerina* and *Gentiana corymbifera*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25: 1-8.
- Morton C.M., Chase M.W., Kron K.A., Swenson S.M., 1996 A molecular evaluation of the monophyly of the order Ebenales based upon *rbcL* sequence data. *Syst Bot* 21: 567–588.
- Muller J., 1981. Fossil pollen records of extant angiosperms. *Bot. Rev. (Lancaster)* 47: 1-142.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Neel J.V., 1973. "Private" genetic variants and the frequency of mutation among South American Indians. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3311-3315.
- Negri G., 1928. Caratteri della vegetazione della Campania, Basilicata e Calabria; in Dainelli G., Caratteristiche fisiche della Campania, Basilicata e Calabria (Guida d'Italia del Touring Club Italiano, Italia meridionale, vol. 3: Campania, Basilicata e Calabria, pp. 36-38, Milano).
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M., 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*. American Elsevier, New York.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Neri F., 1894. Contribuzione alla flora toscana «La flora del volterrano ». *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat. Proc. Verb.* 9: 45-59.
- Nicholls G., 2002. *Alpine Plants of North America*. Timber Press, Portland, Cambridge. 344 pp.
- Nordenstam B., 1987. Notes on South African Anthemideae (Compositae). *Opera Bot.* 92: 147-151.
- Oberprieler C., 2001. Phylogenetic relationships in *Anthemis* L. (Compositae, Anthemideae) based on nrDNA ITS sequence variation. *Taxon* 50: 745-762.
- Oberprieler C., 2004a. On the taxonomic status and the phylogenetic relationships of some unspecific Mediterranean genera of Compositae-Anthemideae I. *Brocchia*, *Endopappus* and *Heliocauta*. *Willdenowia* 34: 39-57.
- Oberprieler C., 2004b. On the taxonomic status and the phylogenetic relationships of some unspecific Mediterranean genera of Compositae-Anthemideae II. *Deveaua*, *Leucocyclus* and *Nananthea*. *Willdenowia* 34: 341-350.

- Oberprieler C., 2005. Temporal and spatial diversification of Circum-Mediterranean Compositae-Anthemideae. *Taxon* 54: 951–966
- Oberprieler C., Vogt R., 2000. The position of *Castrilanthemum* Vogt & Oberprieler and the phylogeny of Mediterranean Anthemideae (Compositae) as inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnL/trnF IGS sequence variation. *Pl. Syst. Evol.* 225: 145-170.
- Oberprieler C., Vogt R., Watson L.E., 2006. Tribe Anthemideae Cass. (1819). In: Kadereit J.W., Jeffrey C. (eds) *The families and genera of vascular plants*, vol. 8, Springer, Berlin.
- Pagni A.M., Orlando R., Masini A., Ciccarelli D., 2003. Secretory structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species. *Israel Journal of Plant Sciences* 51: 185-192.
- Pagni A.M., 1995. Secretory structures in the capitula of *Santolina leucantha* Bertol. (Asteraceae), morphology and histochemistry. *Ann. Bot. (Roma)* 53: 239-249.
- Pagni A.M., Masini A., 1999. Morphology, distribution and histochemistry of secretory structures in vegetative organs *Santolina leucantha* Bertol. (Asteraceae). *Isr. J. Plant Sci.* 47: 257-263.
- Parlatore F., 1889. *Flora Italiana*, vol. 8. Tipografia Le Monnier, Firenze.
- Parsons P.A., 1991. Evolutionary rates: stress and species boundaries. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 1–18.
- Petagna V., 1787. *Institutiones Botanicae*, vol. 2. Typis J. M. Porcelli, Napoli.
- Pizzolongo P., 1963. Note ecologiche e fitosociologiche su *Primula palinuri* Pet. *Annali di Botanica* 27 (3): 451-467.
- Poiret J.L., 1804. *Encyclopedie methodique. Botanique*, 6 : 505. H. Agasse Impr. Paris.
- Poli F., Bonsignore L., Loy G., Sacchetti G., Ballero M., 1997. Comparison between the essential oils of *Santolina insularis* (Genn. Ex. Fiori) Arrigoni and *Santolina corsica* Jord. et Fourr. from the island of Sardinia (Italy). *J. Ethnopharmacol.* 56: 201-208.

- Poljakov P.P., 1967. Systematic and origin of the Compositae. Alma-Ata, Nauka.
- Poulik M. D., 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature 180: 1477.
- Pranker T.L., 1911. On the structure and biology of the genus *Hottonia*. Ann. Bot. 25: 253-268.
- Pretzell D., Reif A., 1999. Erlenbruchwälder im Oberrheingraben und ihre Degradationsstadien. Tuexenia 19: 179-191.
- Primack R.B., 1998. Monitoring rare plants. Plant talk, 15: 29-35.
- Primack R.B., 2008. A primer of conservation biology. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- Primack R.B., Carotenuto L., 2003. Conservazione della natura. Zanichelli, 514 pp.
- Primack R.B., Drayton B., 1997. The experimental ecology of reintroduction. Plant Talk 11: 25-28.
- Provan J., Powell W., Hollingsworth P.M., 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. Trends in Ecology and Evolution 16: 142-147.
- Ramsey J., Schemske D.W., 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 29: 467-501.
- Rasetti F., 1996. I fiori delle Alpi. Torino, Selcom, 222 pp.
- Raven P.H., Axelrod D.I., 1974. Angiosperm biogeography and the continental movements. Ann. Missouri Bot. Gard. 61: 539-673.
- Raymond M., Rousset F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.
- Reitbrecht F., 1974. Fruchtanatomie und systematik der Anthemideae (Asteraceae). Unpublished Thesis, Wien.
- Ricciardi M., 1971. Osservazioni fitogeografiche ed ecologiche sulla *Primula palinuri* Pet. Attuale distribuzione e possibilità di sopravvivenza. Ann. Fac. Sc. Agr. Un. Nap. in Portici, serie 4: 51-59.

- Ricciardi M., 1973. Nuove stazioni di *Primula palinuri* Pet. lungo la costa tirrenica meridionale. *Webbia* 28: 417-421.
- Richards A.J., 1989. *Primulas of the British Isles*. C.I. Thomas and Sons, Aylesbury, U.K.
- Richards A.J., 2002. *Primula*. 2nd ed. B. T. Batsford, London, U.K.
- Rivero-Guerra A.O., 2010. Typification and synonymy of names in *Santolina* (Asteraceae: Anthemideae) published by Hoffmannsegg and Link. *Nordic Journal of Botany* 28: 581–587.
- Robinson H., 1981. A revision of the tribal and subtribal of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian. Contr. Bot.* 51: 1-102.
- Robinson M.A., 1990. *Primulas*. Cronwood Press, Swindon, U.K.
- Rossi W., Corrias B., Arduino P., Cianchi R., Bullini L., 1992. Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Pl. Syst. Evol.* 179: 43-58.
- Rouy G.C.C., 1903. *Flore de France*. Paris, 8: 222-225.
- Sala O.E., Chapin III F.S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzing A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterfield M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M., Wall D.H., 2000. Global biodiversity scenarios for the years 2100. *Science's Compass* 287: 1770-1774.
- Sang T., Pan J., Zhang D., Ferguson D., Wang C., Pan K., Hong D., 2004. Origins of polyploids: an example from peonies (*Paeonia*) and a model for angiosperms. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 561-571.
- Savi G., 1798. *Flora pisana*. P. Giacomelli ed.
- Savolainen V., Chase M.W., Hoot S.B., Morton C.M., Soltis D.E., Bayer C., Fay M.F., De Bruijn A.Y., Sullivan S., Qiu Y.-L., 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcl* gene sequences. *Syst Biol* 49:306–362.

- Schemske D.W., Husband B.C., Ruckelshaus M.H., Goodwillie C., Parker I.M., Bishop J., 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants, *Ecology* 75: 584-606.
- Schenk H., 1886. Die Biologie der Wassergewächse. Bonn
- Schott H., 1851. Die Sippen der österreichischen Primeln. Carl Gerold und Sohn, Vienna.
- Schreuder D., 2001. Windows in the wild: science and sustainability, 1st ed., Stellenbosch University, Stellenbosch, EEPUS.
- Scoppola A., Spampinato G., Giovi E., Magrini S., Cameriere P., 2005. Le entità a rischio di estinzione in Italia: un nuovo Atlante multimediale. In: Scoppola A., Blasi C. (eds.) Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia: 47-78. Società Botanica Italiana. Palombi editore, Roma.
- Selander R.K., Smith M.H., Yang S.Y., Johnson W.E., Gentry J.B., 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation of the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics* VI, Univ. Texas Publ. (Austin) 7103: 49-90.
- Senatore F., De Feo V., 1994. Composition of the essential oil of *Santolina neapolitana* Jordan et Fourr. *Flavour Fragrance J.* 9: 77-79.
- Shaffer M.L., 1981. Minimum population size for species conservation. *BioScience* 31: 131-134.
- Silván A.M., Abad M.J., Bermejo P., Sollhuber M., Villar A., 1996. Antiinflammatory Activity of Coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* 59: 1183–1185.
- Slatkin M., 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* 99: 323-335.
- Slatkin M., 1985a. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.
- Slatkin M., 1985b. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Smith G.F., Burrow B., Lowe D.B., 1984. *Primulas of Europe & America*, Alpine Garden Society, Woking, U.K.

- Smith R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W., Probert R.J. (eds.) 2003. Seed conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Smith W.W., Fletcher H.R., 1948. The genus *Primula*: sections *Cuneifolia*, *Floribundae*, *Parryi* and *Auricula*. Trans. Roy. Soc. Edinb. 61: 631-686.
- Smith W.W., Forrest G., 1928. The sections of the genus *Primula*. Notes R. Bot. Gar. Edinb., 16: 1-50.
- Solereder H., 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons, vol 1. Clarendon Press, Oxford.
- Soltis D.E., Haufler C.H., Darrow D.C., Gastony G.J., 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. American Fern Journal 73: 9-27.
- Soltis D.E., Soltis P.S., 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Critical Reviews in Plant Sciences 12: 243-273.
- Soltis D.E., Soltis P.S., 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 8089-8091.
- Soltis D.E., Soltis P.S., 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. Tree 14: 348-352.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Tate J.A., 2003. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. New Phytologist 161: 173-191.
- Soltis P.S., Soltis D.E., 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 7051-7057.
- Spanowsky W., Casper J., 1959. Zur Chromosomenzahl von *Primula palinuri* Petagna. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 72: 180-182.
- Stanley S.M., 1979. Macroevolution: Pattern and process. Freeman, San Francisco.
- Stepień E., 2008. The protected and vulnerable vascular plants species of mires in the area of the Cedyńia landscape Park (Poland). Natura Montenegrina Podgorica, 7: 303-308.
- Steyermark J.A., 1963. Flora of Missouri. Iowa State University Press, Ames.

- Strausbaugh P.D., Core E.L., 1978, Flora of West Virginia. 2nd edn., Seneca Books, Inc., Grantsville, WV.
- Stuckey R.L., 1983. Absence of certain aquatic vascular plants from the Prairie Peninsula. In: R. Brewer (eds.), Proceedings of the eighth North American Prairie Conference, 1-4 August 1982, Western Michigan University, Kalamazoo, MI, pp. 97-104.
- Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K., Chinnaswamy K., 1997. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. Journal of Ethnopharmacology, 55:151-159.
- Suttill T.A., Allen G.A., 1992. Morphological and chromosomal variation in *Dodecatheon pulchellum* (Primulaceae). Can. J. Bot. 70: 2476-2483.
- Swofford D.L., Selander R.B., 1981. BIOSYS I: A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Swofford D.L., Selander R.B., Black W.C. IV, 1997. BIOSYS-2. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. Thanos C.A., Doussi M.A., 1995. Ecophysiology of seed germination in endemic Labiates of Crete. Isr. J. Plant Sci. 43: 227-237.
- Takhtajan A.L., 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). Bot. Rev. (Lancaster) 46: 225-359.
- Tamm C.O., 1972. Survival and flowering of perennial herbs III The behaviour of *Primula veris* on permanent plots. Oikos 23: 159-166.
- Tammaro F., Pirone G., 1980. Segnalazioni floristiche italiane: 62-65. . Inform. Bot. Ital. 12: 75-77.
- Tansley C., 1903. On the structure of *Schizaea malaccana*. Annals of Botany 17: 498.
- Thanos C.A., Doussi M.A., 1995. Ecophysiology of seed germination in endemic Labiates of Crete. Isr. J. Plant Sci. 43: 227-237.
- Theophrastus E., 1644. Historia Plantarum: 685. Amstelaedami.
- Thieret J.W., Niering W.A., Olmstead N.C., 2001. National Audubon Society Field Guide to North American Wildflowers, Eastern Region. 879 pp.

- Thompson H.J., 1953. The biosystematics of *Dodecatheon*. Contributions from the Dudley Herbarium 4: 73-154.
- Thompson J.D., Lumaret R., 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. Tree 7: 302-307.
- Thorne R., 1983. Proposed new realignment in the angiosperms. Nord. J. Bot. 3: 85-117.
- Tornadore N., Marcucci R., Marchiori S. (2000) Karyology, pollen and seed morphology, and distribution of eight endangered species in the Veneto region (Northern Italy). Pl. Biosystems. 134: 71 – 82.
- Torricelli C., Garbari F., Bedini G., 1999. *Santolina ligustica* (Compositae). Specie da proteggere della flora ligure. Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., ser. B 106: 69-75.
- Tournefort J.P., 1700. Institutiones rei herbariae. Ed. 2, 1 : 460-461. Typ. Regia, Parisiis.
- Trift I., Kallersjö M., Anderberg A.A., 2002. The monophyly of *Primula* (Primulaceae) evaluated by analysis of sequences from the chloroplast gene *rbcL*. Syst. Bot. 27: 396-407.
- Tucci G., Pizzolongo P., 1979. Una pianta rara *Primula palinuri* Petagna. Natura e montagna, 1: 14-19.
- Vaccari L., 1938. Flora della Lucania e della Calabria (Guida d'Italia della Consociazione Turistica Italiana: Lucania e Calabria, pp. 30-33, Milano).
- Valentine D.H., 1972. Primulaceae. In: Flora Europea, vol. III, Cambridge Univ. Press, 3: 14-29.
- Vallès J., Torrell M., Garnatje T., Garcia-Jacas N., Vilatersana R., Susanna A., 2003. The genus *Artemisia* and its allies: Phylogeny of the subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA 152 S. Himmelreich et al.: S hemisphere Anthemideae internal transcribed spacers (ITS). Pl. Biol. 5: 274-284.

- Valverde T., Silvertown J., 1995. Spatial variation in the seed ecology of a woodland herb (*Primula vulgaris*) in relation to light environment. *Funct. Ecol.* 9: 942-950.
- Van Rossum F., Campos De Sousa S., Triest L., 2004. Genetic consequences of habitat fragmentation in an agricultural landscape on the common *Primula veris*, and comparison with its rare congener, *P. vulgaris*. *Conservation Genetics* 5: 231-245.
- Van Rossum F., Triest L. 2003. Spatial genetic structure and reproductive success in fragmented and continuous populations of *Primula vulgaris*. *Folia geobotanica* 38: 239-254.
- Vermeersch S., Triest L., 2006. Distylic *Hottonia palustris* shows high reproductive success in small populations despite low genetic variability. *Aquat. Bot.* 84: 354-358.
- Vuilleumeir B.S., 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the Angiosperms. *Evolution* 21: 210-226.
- Wagenitz G., 1976. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Pl. Syst. Evol.* 125: 29-46.
- Watson L.E., Evans T.M., Boluarte T., 2000. Molecular Phylogeny and Biogeography of Tribe Anthemideae (Asteraceae), Based on Chloroplast Gene *ndhF*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15(1): 59-69.
- Weeda E.J., Westra R., Westra C., Westra T., 1988. Nederlandse ecologische flora. IVN (Ed.) 302.
- Weidema I.R., Siegismund H., Philipp M., 1996. Distribution of genetic variation within and among Danish populations of *Armeria maritima*, with special reference to the effects of population size. *Hereditas* 124: 121-129.
- Weir B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wendel J.F., Weeden N.F., 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D.E. & Soltis P.S. (eds.), *Isozymes in plant biology*. Portland: Dioscorides Press, 5-45.

- Wendelbo P., 1961. Studies in Primulaceae. III. On the genera related to *Primula* with special reference to their pollen morphology. Arbok Universitetet i Bergen, Matematisk-Naturvitenskapelig Serie 1961(19): 1-31.
- Whale D.M., 1984. Habitat requirements in *Primula* species. New Phytologist 97: 665-679.
- Wilson E.O., 1992. The diversity of life. W.W. Norton, New York
- Wilson E.O., 2002. The future of life. Knopf. New York.
- Wolf P.G., Sinclair R.B., 1997. Highly differentiated populations of the narrow endemic plant Maguire Primrose (*Primula maguirei*). Conservation Biology, 11(2): 375-381.
- Wraber M., 1969. Pflanzengeographische Stellung und Gliederung Sloweniens. Vegetatio 17: 176–199.
- Wraber T., Skoberne P., 1989. Rdeči seznam ogroženih praprotnic in semenk SR Slovenije. Varstvo Narave 14–15: 252.
- Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics 16: 97-159.
- Wright S., 1969. Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press.
- Yamada M.M., Guries R.P., 1989. A manual for starch gel electrophoresis: new chocolate lover's edition. Staff paper series number 39, School of Natural Resources, College of Agriculture and Life Science, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA.
- Yamazaki T., 1993. *Primula*. In: K. T. Iwatsuki, K. Yamazaki, D. E. Boufford, H. Ohba (eds.): Flora of Japan, 3a: 87-94. Kodansha, Tokyo, Japan.
- Yang J., Lovett-Doust J., Lovett-Doust L., 1999. Seed germination patterns in green dragon (*Arisaema dracontium*, Araceae). American Journal of Botany 86: 1160 – 1167.
- Young A., Boyle T., Brown T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Tree 11: 413-418.

- Zhang L.B., 2002. Phylogeny, biogeography and systematics of *Soldanella* L. and *Primula* L. sect. *Auricula* Duby (Primulaceae) based on molecular and morphological evidence. Cullivier Verlag, Göttingen, Germany.
- Zhang L.B., Comes H.P., Kadereit J.W., 2004. The temporal course of Quaternary diversification in the european high mountain endemic *Primula* Sect. *Auricula* (Primulaceae). Int. J. Plant Sci. 165: 191-207.
- Zhang L.B., Kadereit J.W., 2004. Classification of *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. Bot. J. of the Linnean Society 146: 1-26.
- Zhang L.B., Kadereit J.W., 2005. Typification and synonymization in *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae). Taxon 54: 775-788.
- Zupančič M., Marinček L., Seliškar A., Puncer I., 1987. Considerations on the phytogeographic division of Slovenia. Biogeographia 13: 89-98.

SITI INTERNET

www.rbgekew.org.uk: Seed Information Database

www.bgci.org: Botanic Gardens Conservation International

www.tela-botanica.org/eflore: Le réseau de la botanique francophone

www.anthos.es: Sistema de información sobre las plantas de España

RINGRAZIAMENTI**Dr. Maria Ansaldi**

(Orto Botanico delle Alpi Apuane P. Pellegrini, Pian della Fioba, Massa)

Prof. Pier Virgilio Arrigoni

(Museo di Storia Naturale di Firenze, Sezione di Botanica, Firenze)

Sig. Gianluca Fapperdue

(Riserva Naturale Selva del Lamone, Farnese, Viterbo)

Dr. Daniele Focardi

(Orto Botanico delle Alpi Apuane P. Pellegrini, Pian della Fioba, Massa)

Dr. Gianluca Forti

(Museo del Fiore, Acquapendente, Viterbo)

Sig. Riccardo Gambogi

(Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli, Pisa)

Dr. Patricia Gutierrez

(Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo)

Dr. J. Lorite Moreno

(Dipartimento di Botanica, Università di Granada)

Prof. Giuseppe Nascetti

(Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo)

Dr. Domitilla Nonis

(Amministrazione Provinciale di Siena, Settore Risorse faunistiche e riserve naturali)

Dr. Daniele Palazzo

(Orto Botanico delle Alpi Apuane P. Pellegrini, Pian della Fioba, Massa)

Dr. Moica Piazzai

(Riserva Naturale Monte Rufeno, Acquapendente, Viterbo)

Prof. Vincenzo Piscopo

(Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università degli Studi della Tuscia)

Dr. Caterina Ripa

(Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo)

Dr. Silva Stefani

(Servizio Scuola, Casa e Ambiente, Bientina, Pisa)

Dr. Alessandra Veroni

(D.G. Politiche Territoriali e Ambientali della Regione Toscana, Settore Tutela e Valorizzazione Risorse Ambientali, Firenze)

Anna Onofri, U. Alessandro Olmati, E. Augusto Olmati